



A  
3  
K  
89

Onderzoek naar de mogelijke ophoping van metabolieten en hun schadelijkheid in een gesloten teeltsysteem (praktijkbedrijf) bij roos.

C. de Kreij, A.M.M van der Burg en N. Garcia

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving  
Sector Glastuinbouw  
November 2002

INTERN VERSLAG

© 2002, Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving BV.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.

Dit onderzoek is gefinancierd door Productschap Tuinbouw



Projectnr. 414349

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving  
Sector Glastuinbouw

Adres : Bornsesteeg 47, Wageningen  
: Postbus 167, 6700 AD Wageningen  
Tel. : 0317 - 47 83 00  
Fax : 0317 - 47 83 01  
E-mail : [info@ppo.dlo.nl](mailto:info@ppo.dlo.nl)  
Internet : [www.ppo.dlo.nl](http://www.ppo.dlo.nl)

# Inhoudsopgave

1. Inleiding
2. Methode
  - 2.1. Groeitesten
  - 2.2. Analyse metabolieten
3. Resultaten
  - 3.1. Groeitesten
  - 3.2. Metabolieten
4. Discussie en conclusie

# 1 Inleiding

Bij rozentelers worden groeistoornissen en productiederving waargenomen als ze over lange tijd de voedingsoplossingen recirculeren. Er is weinig bekend over de giftigheid voor de plant van de afscheidingsproducten / metabolieten van de eigen wortels en micro-organismen (metaboliet = stofwisselingsproduct), die zich zouden kunnen ophopen in de recirculerende voedingsoplossing. Om hierin meer inzicht te krijgen heeft een bedrijf zich bereid verklaard zijn kwekerij in een tweetal afdelingen te verdelen: op één ervan werd de voedingsoplossing volledig gerecirculeerd (verder vuil genoemd); op de andere werd de voedingsoplossing steeds éénmalig gebruikt, dat wil zeggen, de overtollige oplossing, die de planten niet opnamen werd geloosd (verder schoon genoemd). Er werd op het hele bedrijf roos cultivar 'Red Berlin' geteeld in steenwol, die in goten lag. De productiegegevens werden door de kweker verzameld en door LTO-Groeiservice verwerkt. De proef is 1 december 2001 gestart en liep tot 1 september 2002. Uit privacy overwegingen worden naam en adres van de kweker hier verder niet genoemd.

# 2 Methode

## 2.1 Groeitesten

Op 15 januari 2002 zijn er drainwatermonsters van beide objecten genomen en deze voedingsoplossingen werden gebruikt voor een groeitest met snel groeiende gewassen. Er werd per systeem circa 60 liter drainwater verzameld. Voedingsoplossingen werden eerst geanalyseerd op hoofd- en spoorelementen om na te gaan of er verschillen in voedingstoestand tussen de oplossingen waren. De elementgehalten werden in de juiste concentratie gebracht, zodat de verschillen in elementgehalten geen invloed op de proef zouden hebben. Ook is de EC op een standaard gebracht van 1,8 – 2,0 mS/cm met regenwater. Nadat de steenwolpluggen van zes polystyreen kweekbakken met daarin steenwolpluggen (drie herhalingen per voedingsoplossing) bevochtigd waren, zijn op 21 januari drie gewassen per bak gezaaid: tuinkers, koolrabi en sla. Per vak werden per gewas 60 zaden gezaaid (totaal aantal planten in de proef: 3 herhalingen \* 2 behandelingen \* 3 gewassen \* 60 planten = 1080 planten). Na zaaien werden de potten afgestrooid met een laagje vermiculiet (0-3 mm) van ongeveer 0,5 cm. Enkele dagen na zaaien (bij voldoende kieming) werd in de gesloten bak een laagje voedingsoplossing gezet van de betreffende behandeling. De voedingsoplossing werd constant belucht.

De kweekbakken zijn geplaatst in een groeikamer bij een temperatuur van 20-21°C en een (standaard) relatieve luchtvochtigheid van 60%. Er is 16 uur per dag belicht met TL met een intensiteit van 16.000 lux. Aan het eind van de dag werd 30 minuten gloeilamplicht gegeven. De pH werd om de drie dagen gecorrigeerd met zuur en loog om de gewenste pH van 5,5 te krijgen.

Op 3 februari is de kieming bepaald door de gekiemde zaden te tellen. Op 6 februari is een deel (circa 20) van de planten geoogst (eerste oogst). Voor de tweede (en laatste) oogst (11 februari) is het gewas eveneens visueel beoordeeld. Bij de oogst werden de planten geteld en vers gewogen en werd het gemiddelde plantgewicht berekend. De plantgewichten werden statistisch verwerkt met ANOVA (Analysis of Variance).

Ook op 18 augustus 2002 werden drainwatermonsters genomen en hiermee de tweede groeitest gedaan zoals hierboven beschreven, met uitzondering van een extra behandeling en een extra derde oogst. Er werd als extra behandeling een controle meegenomen van een voedingsoplossing bestaande uit meststoffen en regenwater van PPO. Er waren toen: 3 herhalingen \* 3 behandelingen \* 3 gewassen \* 60 planten = 1620 planten in de proef. Verder werden er nu drie oogsten gedaan van iedere oogst circa 15 planten per vak.

## 2.2 Analyse metabolieten

De monsters werden genomen door de kweker uit de steenwolmatten, 's morgens vroeg voorafgaande aan het watergeven op dagen, dat de monsternemer van het Blgg zou monsternemen voor de bepalingen van de hoofd- en spoorelementen. Monsters werden genomen met een PE 'spuit' die al zeer regelmatig voor monsternamen van voedingsoplossingen uit de mat werd gebruikt. Monsters werden genomen van zowel tussen de potten als onder de potten. Monsters werden daarna in 1 L glazen flessen (met teflon afsluitdop) gedaan, die door de monsternemer van Blgg te Naaldwijk werden afgeleverd. Op PPO-Naaldwijk werden de monsters direct gekoeld op 5 °C en daarna naar Groen Agro Control (GAC) te Delft gebracht voor analyse. Er werd door PPO een standaard gemaakt van fumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, p-coumaric acid, benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid en 2,4-dichlorobenzoic acid. De concentratie van alle genoemde stoffen in demi-water was 1 mmol/l. Omdat de pH door toevoeging van de zuren sterk zou dalen en de oplosbaarheid van de zuren daarmee sterk zou afnemen werd ook chemisch zuiver Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> toegevoegd in een concentratie van 1 g/l. Ook daarmee loste enkele zuren slecht op. Zodoende werd de oplossing verwarmd tot circa 30 °C op een magneetroerder. Na enkele uren waren alle stoffen volledig opgelost. De oplossing was licht geel gekleurd. Deze bleef helder (er ontstonden geen neerslagen meer). De standaard werd koel bewaard. De formules en dergelijke staan in bijlage 1. In februari 2002 werd dezelfde standaard meegestuurd naar GAC. In maart werd een nieuwe standaard gemaakt. Om de zuren op te lossen werd ook natriumcarbonaat bijgevoegd, maar de oplossing werd niet verwarmd; de oplossing bleek na een nacht over staan, helder te zijn. De latere monsters dan monsternamen maart 2002 werden geanalyseerd met een door GAC zelf gemaakte standaard. Daartoe had GAC de betreffende stoffen van PPO gekregen met de bijbehorende molecuulmassa's. Standaarden werden toen apart per stof aangemaakt en niet in één oplossing, zoals daarvoor werd gedaan. De standaard voor salicylic acid werd steeds door GAC zelf aangemaakt. Monsters werden aangezuurd en daarna gemethyleerd en ingebracht in de GC-MS.

Voor de kwalitatieve analyse werden van het GC-MS chromatogram alle pieken met een hoogte groter dan  $5 \cdot 10^5$  counts geïdentificeerd met de National Institute of Standard and Technology (NIST) bibliotheek. De kwalitatieve analyse werd uitgevoerd in de monsters van 15 januari 2002 en van 17 juni 2002

### 3 Resultaten

#### 3.1 Groeitesten

##### *Eerste Groeitest*

De analyseresultaten van de voedingsoplossingen van de eerste groeitest staan in bijlage 2. Er zijn slechts kleine verschillen tussen de drainwatermonster vuil en schoon.

Bij de eerste oogst waren de gemiddelde plantgewichten 0,81 ; 0,86 en 1,11 gram per plant voor respectievelijk koolrabi, sla en tuinkers. Er waren geen significante verschillen tussen de behandelingen.

In tabel 1 zijn de kiem percentages, plantgewichten en groeiremming weergegeven; dit is het versgewicht van de planten, die groeiden op de voedingsoplossing met recirculatie (vuil) en van het drainerende systeem (schoon). Tijdens de visuele beoordeling op 11 februari viel op dat de koolrabi plantjes van de "vuile" voedingsoplossing achter bleven in één van de drie bakjes. Ook bij een andere van de bakjes met "vuile" oplossing en één met "schone" oplossing vertoonde de koolrabi bladvergeling.

De groei op de "vuile" oplossing ten opzichte van de "schone" van de koolrabi en in mindere mate van de tuinkers was geremd. Gemiddeld was er een betrouwbaar verschil van 96 % tussen de twee oplossingen.

*Tabel 1 -* Kiempercentages, gemiddelde plantgewicht tweede oogst van beide behandelingen. Het groeiremming in uitgedrukt voor de "vuile" behandeling in vergelijking met de "schone".

gewas			
		schoon	vuil
tuinkers	Gemiddelde kieming (%)	96.3	99.4
	Gemiddelde plantgewicht (g)	4.0	3.4
	Gemiddelde van remming....(%)		13.6
koolrabi	Gemiddelde kieming (%)	90.6	87.3
	Gemiddelde plantgewicht (g)	3.4	2.3
	Gemiddelde van remming....(%)		31.4
sla	Gemiddelde kieming (%)	99.4	98.2
	Gemiddelde plantgewicht (g)	3.9	3.9
	Gemiddelde van remming....(%)		g.r.

g.r. is geen remming

### *Tweede groeitest*

De analyses van de voedingsoplossingen staan in bijlage 2. Er zijn slechts kleine verschillen tussen de drainwatermonsters vuil en schoon. Er werd bijgestuurd met ammonium, extra meststoffen en ijzer (voor de PPO-standaard), om de gewenste, gelijke voedingsconcentraties te krijgen in de voedingsoplossingen van de verschillende behandelingen. In de standaard werd met ijzer in de vorm van EDDHA bijgesteld, omdat de monsters van het drainwater nogal rood gekleurd waren. Er werd vermoed, dat er Fe-EDDHA door de betreffende kweker werd gebruikt. Een overzicht is gegeven in de foto (zie eind).

De kiempercentages waren 99, 99 en 98 % voor respectievelijk koolrabi, sla en tuinkers. Op de drie oogstdata waren de gemiddelde gewichten bij koolrabi 0,66 ; 0,98 en 3,14 gram per plant; bij sla was het 0,43 ; 0,87 en 2,98 gram per plant en bij tuinkers was het 0,16 ; 1,21 en 3,42 gram per plant. Er waren geen statistisch betrouwbare verschillen tussen de behandelingen.

## 3.2 Metaboliëten

### *Kwalitatieve GC-MS scans*

In de GC-MS scans (monsternamen datum 15 januari en 17 juni 2002) is een grote hoeveelheid metaboliëten gevonden. Een aantal ervan kwamen in 'meetbare' (pieken met een hoogte groter dan  $5 \cdot 10^5$  counts) concentraties voor. Deze stoffen kwamen in beide monsters "schoon" en "vuil" voor. Het ging om:

tetradecanoic acid,  
hexadecanoic acid,  
octadecanoic acid,  
docosanoic acid,  
tetracosanoic acid,  
hexacosanoic acid,  
eicosanic acid  
docosanic acid

Hexadecene  
Octadecene  
docosene  
docosane  
nonadecene  
eicosane  
heneicosane  
squalane.

Ethanol-2-(2 butoxyethoxy)-2 acetate (waarschijnlijk afkomstig van uitvloeier)

1,2-benzenedicarboxylic acid (phthalic acid): waarschijnlijk uit omgeving (weekmaker in kunststoffen en coatings (verven))

1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-methylpropyl)ester

### *Kwantitatieve GC-MS analyses*

Met behulp van oplossingen met bekende concentraties van een 11-tal stoffen is gericht gezocht naar de aanwezigheid van deze stoffen in de geanalyseerde mat monsters. Indien aanwezig, is de concentratie van deze stoffen bepaald.

Van alle onderzochte stoffen zijn slechts 4 stoffen gevonden in concentraties boven de detectiegrens. Het gaat hierbij om benzoëzuur, para-hydroxy-benzoëzuur, 2,4-dichlorobenzoëzuur en salicylzuur. In tabel 2 zijn de stoffen en hun aangetoonde concentratie in de loop van de tijd weergegeven. Overige stoffen (fumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid en vanillic acid) hadden steeds een concentratie lager dan 0,01 µmol/l.

*Tabel 2– Gemeten concentraties van aanwezige metabolieten in de drainoplossingen per monsternamedatum.*

oplossing	stof	datum monsternamedatum in 2002				
		15-01	12-02	05-03	13-05	17-06
"Schoon"	benzoic acid, µmol/l	0.08	0.09	0.10	0.10	0.09
	p-hydroxybenzoic acid, µmol/l	5.10	6.90	7.40	<0.01	<0.01
	2-4 dichlorobenzoic acid, µmol/l	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	salicylic acid, µmol/l	0.50*)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
"Vuil"	benzoic acid, µmol/l	0.11	0.11	0.09	0.06	0.04
	p-hydroxybenzoic acid, µmol/l	2.40	6.50	6.30	5.30	<0.01
	2-4 dichlorobenzoic acid, µmol/l	0.15	0.00	<0.01	<0.01	<0.01
	salicylic acid, µmol/l	0.50*)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

\*) Indicatieve waarde.

Tabel 2 laat zien dat benzoëzuur en para-hydroxy-benzoëzuur in bijna alle monsters zijn gevonden; 2,4-dichlorobenzoëzuur en salicylzuur alléén bij de eerste monsternamedatum. De concentraties van deze stoffen zijn in de tijd wisselend en vergelijkbaar voor beide monsters ("schoon" en "vuil") gebleken. Zie ook grafieken 1 en 2.



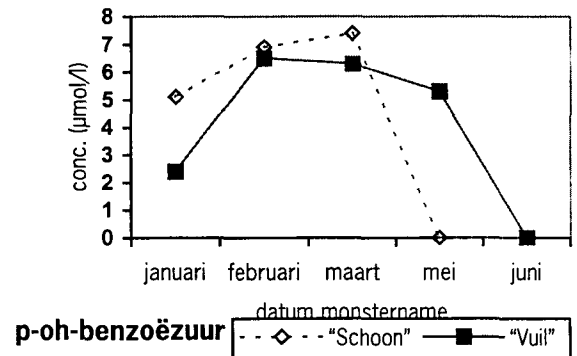
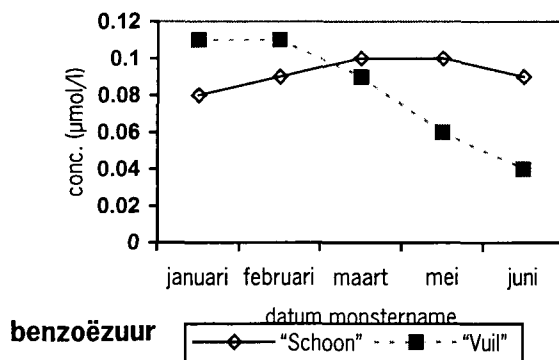


Fig 1 en 2. Gehalten aan benzoëzuur en p-hydroxybenzoëzuur.

#### 4 Discussie en conclusie

Koolrabi en tuinkers geteeld op drainwater van het recirculerende systeem (vuil) bleef in de eerste test achter in groei ten opzichte van de groei in drainwater van het open systeem (schoon). In de tweede groeitest werden geen significante verschillen gevonden in de groei van alle drie de geteste gewassen (sla, tuinkers en koolrabi). Het is niet duidelijk, waarom in de eerste test wel en in de tweede test geen verschil werd gevonden.

In de monsters uit de matten werden concentraties benzoëzuur en para-hydroxy-benzoëzuur gevonden van respectievelijk circa 0,1 en 2 - 7 µmol/l. Uit literatuur is bekend, dat concentraties boven 20 – 50 µmol/l schadelijk kunnen zijn. De genoemde concentraties zijn niet schadelijk. Een aantal andere metabolieten kwamen beneden de detectielimiet voor (< 0,01 µmol/l). In de GC-MS scan zijn nog andere metabolieten gevonden, dan vooraf werd verondersteld. Het is niet bekend in welke concentratie deze voorkomen.

Ethanol-2-(2 butoxyethoxy)-2 acetate is waarschijnlijk afkomstig van een uitvloeier; 1,2-benzenedicarboxylic acid (phthalic acid) is waarschijnlijk uit een weekmaker in kunststoffen en coatings (verven) en 1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-methylpropyl)ester (ftalaat) is waarschijnlijk afkomstig van een ook weekmaker.

Het vermoeden is, dat er door het extra spoelen van de voedingsoplossing van beide delen van het bedrijf in november 2001 een andere samenstelling van de (recirculerende) voedingsoplossing is ontstaan dan daarvoor aanwezig was.

De elementgehalten van de drainwatermonsters van het gesloten systeem waren vrijwel identiek aan die van het open systeem. Dit is afwijkend van wat meestal in proeven, waarbij open en gesloten systeem naast elkaar werden vergeleken, werd gevonden. In proeven werden in een gesloten systeem meestal een hoger Zn-, Na-, Cl- en Si-gehalte gevonden dan in een open systeem.



Tweede groeitest dd 16 september 2002. Negen bakken (3 behandelingen \* 3 herhalingen) gevuld met beluchte voedingsoplossing. Teelt van sla, tuinkers en koolrabi.

Bijlage 1. Standaard metabolieten voor GC-MS dd 14 januari 2002 en maart 2002, aangemaakt door PPO.

Triviale naam	Chemische naam	Formule	Molecuulmassa *)
Benzoic acid		C7H6O2	122.12
Fumaric acid		C4H4O4	116.07
2,4-Dichlorobenzoic acid		C7H4Cl2O2	191.01
p-Hydroxybenzoic acid		C7H6O3	138.12
Vanillic acid	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	C8H8O4	168.15
Protocatechuic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid	C7H6O4	154.12
p-Coumaric acid	4-hydroxycinnamic acid (predominantly trans)	HOC6H4CH=CHCO2H	164.16
Gallic acid		(HO)3C6H2CO2H	170.12
Ferulic acid	Trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	HOC6H3(OCH3)=CHCO2H	194.19
Chlorogenic acid	1,3,4,5-tetrahydroxy-cyclohexanecarboxylic acid		354,3

\*) De molecuulmassa geeft ook het gehalte in mg/l om een concentratie te krijgen van 1 mmol/l.

Bijlage 2. Elementgehalten van de monsters voor de groeilesten

datum	monster	pH	EC [mS/cm]	NH4 [mmol/l]	K [mmol/l]	Na [mmol/l]	Ca [mmol/l]	Mg [mmol/l]	Si [mmol/l]	NO3 [mmol/l]	Cl [mmol/l]	SO4 [mmol/l]	HCO3 [mmol/l]	P [mmol/l]	Fe [µmol/l]	Mn [µmol/l]	Zn [µmol/l]	B [µmol/l]	Cu [µmol/l]	Mo [µmol/l]
<i>Eerste groeifase</i>																				
17/01/2002	Drainwater vuil niet bijgesteld	5.87	2.34	0	4.7	2.3	5.3	2.5	0.82	13.5	2.0	1.9	0.1	1.14	69.9	1.9	22	49	1.17	0.2
17/01/2002	Drainwater schoon niet bijgesteld	5.97	2.42	0	4.6	2	5.7	2.8	0.65	14.2	1.7	2.3	0.1	0.99	56.5	3.4	17.4	40	0.96	0.2
<i>Tweede groeifase</i>																				
20/08/2002	Standaard PPO Water+mest	5.74	1.5	0.94	4.8	0.1	2.5	0.8	0	10.5	0.1	1.1	0	0.69	5.2	4.5	3	10	0.68	0.1
20/08/2002	Drainwater Vuil niet bijgesteld	6.04	2.12	0	4.6	1.5	4.2	2.5	0.58	12.7	1.6	2.2	0.1	1.53	53.6	2	10.6	32	1.14	0.7
20/08/2002	Drainwater Schoon niet bijgesteld	5.73	2.1	0	4.5	1.4	4	2.3	0.53	12.2	1.6	2.1	0.0	1.5	55.7	3.3	11.6	33	1.24	0.6
05/09/2002	Standaard PPO bijgesteld	5.91	2.17	1.2	7.8	0.3	3.6	1.4	0.02	14.9	0.0	1.4	0.1	1.06	56.4	7.8	5.2	18	1.54	0.2
05/09/2002	Drainwater vuil bijgesteld	5.82	2.36	1.1	5.4	1.6	4.3	2.8	0.6	14.6	1.7	2.3	0.1	1.65	48.3	3.2	11.7	31	1.57	0.7
05/09/2002	Drainwater schoon bijgesteld	5.79	2.35	1.2	5.3	1.6	4.3	2.7	0.55	14.4	1.7	2.2	0.0	1.63	51.2	4.5	12.5	35	1.55	0.6
16/09/2002	Standaard PPO bijgesteld eind	6.98	2.22	0.3	6.7	0.5	3.5	2.1	0.05	16.4	0.0	1.7	1.2	0.67	58.3	7.4	4.7	24	2.45	0.2
16/09/2002	Drainwater vuil bijgesteld eind	6.71	2.19	0	4.3	1.5	3.9	2.9	0.48	14.2	1.4	2.3	1.1	1.05	53.6	4.5	10.1	29	1.97	0.7
16/09/2002	Drainwater schoon bijgesteld eind	6.53	2.33	0.2	3.8	2.1	4.3	3.5	0.64	14.6	2.1	2.6	0.8	1.3	55.6	4.9	13.9	36	1.79	0.8