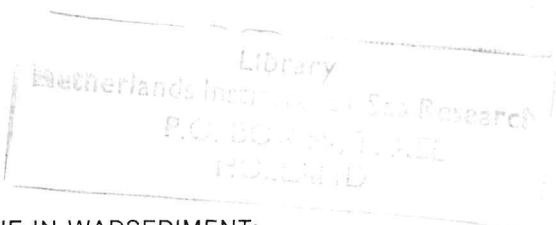


296206

© 1988

This report is not to be cited without the consent of:
Netherlands Institute for Sea Research
P.O. Box 59, 1790 AB DEN BURG,
Texel, The Netherlands

This is published as NIOZ - report 1988 - 5
This series was formerly called:
Interne Verslagen
Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee
Texel



DE REGULATIE VAN N₂O PRODUCTIE IN WADSEDIMENT:

—Een holistische benadering

MARION VAN RIJSSEL

Doctoraalonderwerp Biologie Rijksuniversiteit Groningen van juli 1985 tot februari 1986 op het Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (Texel).

Onder begeleiding van: Prof. Dr. H. Veldkamp (RUG)

Dr. W. Helder (NIOZ)

Ik dank Wim Helder,
Joop Bakker,
Pim Keskamp,
Peter Lock,
Rob de Vries,

en alle NIOZ medewerkers voor hun bijdrage.

INHOUD

Summary	2
1. Inleiding	2
1.1. De stikstofcyclus	2
1.2. Nitrificatie	2
1.3. Denitrificatie	3
1.4. Nitrificatie en denitrificatie in sediment	3
1.5. N ₂ O	4
1.6. Doel van het onderzoek	4
2. Materiaal en methoden	4
2.1. Proefopzet	4
2.2. Gasanalyse	5
2.2.1. Gastheorie	5
2.2.2. N ₂ O bepaling	5
2.2.3. O ₂ bepaling	6
2.3. Homogenisatie	7
2.4. Nutriëntenanalyse	8
2.5. Sedimentdichtheid	8
3. Resultaten	8
3.1. Bespreking van twee incubaties	8
3.2. Overzicht incubaties	8
4. Discussie	9
4.1. N ₂ O accumulatie	9
4.2. N ₂ O afname	10
4.3. N ₂ O productiesnelheid	10
4.4. Model	10
4.5. Consequenties	11
5. Literatuurlijst	11
6. Appendix	13

SUMMARY

The relationship between oxygen and N_2O production was investigated in sediment of a tidal flat (Mokbaai, Texel). The sediment was diluted with seawater and incubated in darkened bottles. The sediment (10-20 vol %) was kept in suspension by continuous shaking. The oxygen decrease, by respiration and oxydation, was followed, together with N_2O production, by means of an headspace technique. The concentration of NO_3 and NO_2 was also monitored.

Accumulation of N_2O was observed when the oxygen concentration was below $28 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$. N_2O decrease occurred below $11.3 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$. This decrease could be stopped by adding NO_3 up to a concentration of $30 \mu\text{mol/l}$, resulting in a renewed accumulation of N_2O .

The maximum accumulation rate measured was $11 \text{ nmol/cm}^3 \cdot \text{h}$. The maximum N_2O concentration was 1600 nmol/l .

These results indicate that oxygen and nitrate regulate the production of N_2O . The possibility of a nitrification-denitrification pathway summarized by: $NH_4 \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ is pointed out.

nitraat. Dit oxidatieproces heet nitrificatie. Nitrificatie is onder te verdelen in twee deelprocessen. De oxidatie van ammonium tot nitriet wordt uitgevoerd door bacteriën van het geslacht *Nitrosomonas* (ook door *Nitrosococcus*). De tweede stap van nitriet naar nitraat wordt uitgevoerd door *Nitrobacter*soorten (ook *Nitrospira* & *Nitrococcus*).

Stikstof in de geoxydeerde vorm van nitraat, nitriet en lachgas (N_2O) kan worden gebruikt als terminale acceptor van een ademhalingsketen (b.v. nitraatademhaling). Het totale proces wordt samengevat onder de noemer van dissimilatieve nitraatreductie. Wanneer als eindproducten stikstofgas en lachgas ontstaan is er sprake van denitrificatie (FENCHEL & BLACKBURN, 1978).

Het grootste deel van de atmosfeer bestaat uit stikstofgas. Door stikstoffixatie kan dit chemisch inerte gas in de biosfeer gebracht worden. Denitrificatie maakt stikstof vrij uit biologisch bruikbare gebonden stikstof. Beide processen houden de hoeveelheid gebonden stikstof min of meer constant, hoewel deze hoeveelheid op een geologische tijdschaal wel blijkt te variëren (MC ELROY, 1983).

1. INLEIDING

1.1. DE STIKSTOF CYCLUS

De stikstofcyclus bestaat uit een aantal gekoppelde processen (Fig. 1). Dat komt doordat stikstof in verschillende vormen, in verschillende biologische processen wordt gebruikt.

Stikstof in de cel komt vooral voor in eiwitten en polynucleotiden. Het wordt opgenomen, door planten en bacteriën, in de vorm van nitraat en ammonium voor het anabolisme. Bacteriën van o.a. het geslacht *Rhizobium* zijn in staat in hun stikstofbehoefte te voorzien door fixatie van atmosferische stikstof. Deze stikstoffixatie kost energie.

Organische stikstof kan door excretie of afbraak van dode organismen vrijkomen in het milieu. Micro-organismen zetten het om in ammonia. Dit proces wordt ammonificatie genoemd.

Stikstof in de gereduceerde vorm van ammonium kan als electrondonor gebruikt worden door een aantal aerobe chemoautotrofe bacteriën. Ammonium wordt daarbij omgezet in

1.2. NITRIFICATIE

De bacteriën die verantwoordelijk zijn voor nitrificatie zijn chemolitho-autotroof. De energieopbrengst voor de oxydatie van ammonium tot nitriet is groter dan die voor de oxydatie van nitriet naar nitraat, resp. 65 en 18.2 Kcal/mol . Het is niet aangetoond dat N_2O een obligaat intermediair van nitrificatie is. Wel staat vast dat N_2O kan ontstaan in nitrificatieprocessen (GOREAU *et al.*, 1980). Verschillende verklaringen bestaan voor deze N_2O productie. Lachgas zou in chemisch evenwicht kunnen zijn met een obligaat intermediair, zoals NH_2OH (RAJENDRAN & VENUGOPOLAN, 1976). Het is ook mogelijk dat N_2O ontstaat wanneer nitriet toxische concentraties bereikt. Verder is bij *Nitrosomonas europaea* aangetoond dat N_2O niet ontstaat bij oxydatie van ammonium, maar bij reductie (=denitrificatie) van nitriet. Bij lage zuurstof concentraties zou dan nitriet als terminale electron acceptor op kunnen treden en zo de N_2O productie veroorzaken die bij nitrificatie lijkt op te treden (POTH & FOCHT, 1985).

Nitrificeerders groeien niet snel. Enkele factoren die de groei beïnvloeden worden hieronder

genoemd.

—Zuurstof: Nitrificatie kan nog plaatsvinden bij $[O_2] \geq 6 \mu\text{mol/l}$. Beneden deze concentratie treedt inhibitie van nitrificatie op (BILLEN, 1975). Nitrosomonas soorten hebben een hogere afiniteit voor zuurstof dan Nitrobacter soorten. Hierdoor kan bij lage zuurstofconcentratie accumulatie van nitriet plaatsvinden. Nitrificeerders zijn in staat perioden van zuurstoflimitatie te overleven (PAINTER, 1970). Bij een gemixte continuculture van een Nitrosomonassoort en een Nitrobactersoort, beiden geïsoleerd uit het Dollard estuarium, bleek de oxydatie van nitriet naar nitraat al geïnhibeed te zijn bij zuurstofconcentraties lager dan $95 \mu\text{mol } O_2/\text{l}$. De oxydatie van ammonium was geïnhibeed bij concentraties lager dan $32.5 \mu\text{mol } O_2/\text{l}$ (HELDER & DE VRIES, 1983). Bij nitrificeerders werd een hogere productie van N_2O waargenomen bij zuurstofconcentraties rond $10 \mu\text{mol/l}$. (GOREAU, 1980).

—Temperatuur: De optimum temperatuur voor Nitrosomonas is tussen 30 en 36°C . (BUSWELL *et al.*, 1954). Voor Nitrobacter soorten zijn meer koudegevoelig dan Nitrosomonas soorten, waardoor soms nitrietophoping optreedt (CAMPELL & LEES, 1967).

—Zuurgraad: Nitrificatie kan plaatsvinden in een optimum pH range van 6 tot 9. Nitrificeerders zijn partikel gebonden. Als reden hiervoor is genoemd de pH-bufferende werking van de partikeloppervlakken (FENCHEL & BLACKBURN, 1978).

1.3. DENITRIFICATIE

Op plaatsen waar geen of weinig zuurstof aanwezig is, nemen andere ionen de plaats van zuurstof, als terminale acceptor, over. De energie die bij de respiratie kan worden gegenereerd is per acceptor verschillend. De $\Delta G'$ voor zuurstof is niet veel hoger dan die voor mangaan en nitraat. Het is dan ook te verwachten dat deze ionen bij genoemde anaerobe omstandigheden worden gereduceerd (FROELICH *et al.*, tabel 1).

Overmaat zuurstof inhibeert dissimilatieve nitraatreductie (FENCHEL & BLACKBURN, 1978). Nitraatreductie door *Paracoccus denitrificans* en *E. coli* werd geremd door toevoeging van zuurstof; deze kwam weer op gang bij anaerobe omstandigheden (JOHN, 1977). In chemostaat experimenten werd, door *Pa. denitrificans*, nitraat omgezet in N_2 in afwezigheid van zuurstof. Bij toenemende zuurstofconcentratie waren resp.

N_2O en nitriet eindproduct van de nitraatreductie. Bij atmosferische zuurstofwaarden werd helemaal geen nitraat gereduceerd. Bij toenemende zuurstofconcentratie wordt de denitrificatie in toenemende mate geïnhibeed (HOCHSTEIN *et al.*, 1984). ROBERTSON & KUENEN (1984) definieerden "aerobe denitrificatie" als denitrificatie waarbij de terminale cytochroomoxidase zuurstof verzadiging is, d.w.z. denitrificatie bij zuurstofconcentraties hoger dan $6 \mu\text{mol } O_2/\text{l}$.

Behalve zuurstof beïnvloeden nog andere factoren de denitrificatie. Denitrificeerders zijn over het algemeen hetrotroof, daardoor kan limitatie optreden door gebrek aan substraat. De optimum pH voor denitrificeerders is tussen 5.8 en 9.2 (DELWICHE & BRYAN, 1976). De optimum temperatuurrange is van 15 tot 35°C . Beneden 5°C treedt sterke inhibitie op.

Naast zuurstof speelt nitraat een grote rol in de regulatie van denitrificatie. De denitrificatiesnelheid in een Deens estuarium daalde van 5.1 tot $0.3 \text{ mmol/m}^2 \cdot \text{d}$, nadat de nitraatconcentratie daalde van 50 tot 5 mmol/l (JENSEN *et al.*, 1984). Oremland vond een hogere denitrificatiesnelheid na verhoging van de nitraatconcentratie van 5 naar $100 \mu\text{mol/l}$ (1984).

1.4. NITRIFICATIE EN DENITRIFICATIE IN SEDIMENTEN

Een groot deel van de globale nitrificatie en denitrificatie speelt zich af in de mariene milieu. Met name in het sediment van estuaria (HATTORI, 1983; KAPLAN, 1983). Door de zuurstof gradiënt die zich in deze milieu's bevindt, is zowel nitrificatie als denitrificatie mogelijk. Voor de samenhang tussen de twee processen is het volgende model gepostuleerd (BILLEN, 1978; FENCHEL & BLACKBURN, 1978; Fig. 2).

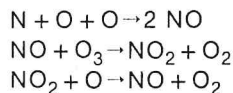
In the aerobe gedeelte van het sediment wordt ammonium genitrificeerd tot nitraat. Wanneer nitraat in het anaerobe gedeelte van het sediment komt, wordt het gereduceerd tot N_2 , N_2O of ammonium. De gasen kunnen aan het sediment ontsnappen, het ammonium kan na diffusie weer genitrificeerd worden in aerobe omgeving. Netto resultaat is een omzetting van organisch gebonden stikstof, nitraat en ammonium tot N_2 en N_2O .

De begrippen aeroob en anaeroob zijn goed gedefinieerd als omstandigheden met en zonder

zuurstof. Toch zijn deze termen in bovenstaand model niet geheel op hun plaats. Nitrificatie kan nog plaatsvinden bij betrekkelijk hoge zuurstofconcentraties en denitrificatie bij betrekkelijk hoge zuurstofconcentraties??. Er moeten dus plaatsen bestaan in het sediment waar de twee processen naast elkaar bestaan.

1.5. N₂O

Een van de componenten die zowel in nitrificatie als denitrificatie een intermediair is, is lachgas. Dit gas kan vanuit beide processen vrijkomen in de atmosfeer. Toename van N₂O in de atmosfeer kan aanleiding geven tot aantasting van de ozonlaag.



Door het gebruik van kunstmatig gefixeerde stikstof in kunstmest, wordt het milieu met stikstof belast waardoor indirect N₂O kan ontstaan. Daarnaast neemt de hoeveelheid N₂O in de atmosfeer direct toe door het ontstaan van N₂O bij de verbranding van fossiele brandstoffen. Met deze toenemende hoeveelheid N₂O is ook de belangstelling voor mogelijke effecten ontstaan.

Bij de (natuurlijke) N₂O productie speelt zuurstof een sterk regulerende rol. Uit de literatuur blijkt dat op verschillende plaatsen bij lage zuurstofconcentraties hoge N₂O concentraties voorkomen. In het upwellingsgebied bij Peru zijn N₂O concentraties gemeten tot 5 µg/l. Bij zuurstofconcentraties beneden 42 µmol/l (CODISPOTI, 1985). Lachgasconcentraties in batchcultures van landbouwgrond bleken toe te nemen bij zuurstofconcentraties beneden 94 µmol/l (FIRESTONE, 1979). In het zoetwatermeer Kizaki (Japan) zijn N₂O concentraties gemeten tot 3.8 µmol/l bij zuurstofconcentraties van 4.2 µmol/l (YOH, 1983).

Een verhoogde N₂O productie werd waargenomen in batches van sediment in Denemarken. Vanuit nitrificatie werd N₂O geproduceerd tussen 1.0 en 2.5 µmol O₂/l; vanuit denitrificatie bij [O₂] < 57 µmol/l onstond een toenemende productie tot [O₂] = 0 mol/l aantoe (JØRGENSEN, 1984).

Nitraat heeft ook een belangrijke invloed op N₂O productie. In het Alesha estuary (Oregon)

was de N₂O concentratie 6.7 - 8.6 nM, een maand later was de concentratie 10.1 - 18.6 nM. Deze stijging hing samen met een nitraat stijging van 0.06 naar 21.7 µM (ANGELIS & GORDON, 1985). Liu vond een lineair verband tussen N₂O productie en de concentratie van nitriet en nitraat samen (alleen als de gezamenlijke concentratie kleiner was dan 20 µmol/l (JENSEN, 1984).

Een lage pH (<5) bleek ook van invloed op N₂O productie. Het voornaamste eindproduct van denitrificatie verschuift van N₂ naar N₂O (DELWICHE, 1978).

1.6. DOEL VAN HET ONDERZOEK

De inhibitie van denitrificatie door zuurstof, en de inhibitie van nitrificatie door tekort aan zuurstof suggereren een omschakeling van deze processen bij lage zuurstofconcentraties. Lachgas accumulatie blijkt dan ook op te treden bij lage zuurstofconcentraties. Om meer inzicht te krijgen in N₂O productie, met name de invloed van zuurstof daarop, is als doel van dit onderzoek gesteld, om in wadsediment de relatie tussen zuurstof en N₂O productie te onderzoeken.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. PROEFOPZET

Om de relatie tussen zuurstofconcentratie en N₂O productie in wadsediment te onderzoeken is gekozen voor laboratorium experimenten. Dit omdat veldexperimenten teveel technische en praktische problemen met zich mee zouden brengen.

Voor de hand ligt misschien een opstelling waarbij sediment zich bevindt in een gesloten ruimte met reguleerbare zuurstofomstandigheden. Hier is echter uitgegaan van het principe van de batchculture, zodat ingewikkelde zuurstofregulatie niet nodig is.

In een afgesloten ruimte met sediment vindt, door metabolische activiteit, respiratie plaats. Wanneer fotosynthetische processen worden uitgesloten, zal na verloop van tijd de zuurstofconcentratie in die ruimte gaan dalen omdat oxydatie van organische koolstof door heterotrofe bacteriën plaatsvindt. Deze zuurstofconcentratiedaling en het verloop van de lachgasconcentratie kan gemeten worden.

Wadsediment werd bij laagwater gemonsterd

in de Mokbaai (zuidpunt van Texel). Er werden cores gestoken ($\varnothing$ 5 cm) tot een diepte van 10 cm. Microbiële activiteit bevindt zich vooral in de bovenste centimeter van het sediment (ANDERSEN, 1984; OREMLAND, 1984). Tellingen van nitrificatoren en denitrificatoren gaven aan dat deze organismen zich vooral in de bovenste vier cm bevinden (RUTGERS VAN DER LOEFF *et al.*, 1981). Naast sediment werd water uit de baai gemonsterd in plastic flessen.

Direct na aankomst in het lab (ong. 20 min. later), werden de sedimentincubaties ingezet (Fig. 3). Daartoe werd ong. 100 gram nat sediment afgewogen en overgebracht in een $\frac{1}{2}$ liter serumfles. Het gemonsterde en gefiltreerde zeewater werd aan het sediment toegevoegd tot een totaal suspensievolume van 400 of 500 ml (porositeit 0.8-0.9). Na doorborrelen met lucht of N_2 gas werd de fles gasdicht afgesloten m.b.v. een septumschroefdop. Een laag aluminiumfolie om de fles zorgde voor afscherming van licht.

Vanaf tijdstip $t = 0$ werden de flessen geschud om het sediment homogeen in suspensie te houden (zie homogenisatie). Met regelmatige tussenpozen werden gasmonsters uit de headspace genomen voor analyse van $[N_2O]$ en $[O_2]$ (zie gasanalyse). Bij enkele incubaties zijn daarnaast watermonsters genomen voor nutriëntenanalyse. De temperatuur van het lab varieerde tussen 18 en 20°C. De saliniteit van de monsters is slechts twee keer gemeten, de waarden bedroegen 27 en 30‰.

2.2. GASANALYSE

2.2.1. GASTHEORIE

Wanneer in een gesloten ruimte zich een vloeistof- en een gasfase bevindt is het mogelijk door meting van een gasconcentratie in de headspace, ook de concentratie van dat gas in de vloeistoffase te berekenen. Deze z.g. headspace techniek is gebaseerd op de volgende natuurwetten:

- 1) Eerste wet van Dalton: "In een mengsel van gasen gedragen de afzonderlijke gasen zich onafhankelijk van elkaar". Dit betekent dat de interacties tussen de verschillende gasen buiten beschouwing gelaten kunnen worden.
- 2) Tweede wet van Henry: "De massa van een gas, opgelost in een bepaald volume oplosmid-

del, bij constante temperatuur en druk, is evenredig met de partiële druk van het gas boven dat oplosmiddel". In vergelijking:

$$M = k \cdot p$$

Waarin M = massa opgelost gas, k = constante en p = de partiële druk van het gas. Deze vergelijking kan ook worden geschreven als;

$$k = \frac{M}{p} \quad \text{Bunsen formuleerde dat als volgt:}$$

$$B(T, S) = \frac{\text{concentratie gas in oplosmiddel}}{\text{concentratie gas in headspace}}$$

De constante K ($K = B/V +$) is bekend voor een aantal combinaties van temperatuur en saliniteit (WEISS & PRICE, 1980). Het is duidelijk dat door bepaling van de gasconcentratie in één van de compartimenten, met behulp van deze constante, ook de concentratie in het andere compartiment berekend kan worden. Voor concentratie-bepalingen in de headspace zijn kleine volumina nodig. Hierdoor kan vaak gemonsterd worden zonder dat de incubatie als geheel gestoord wordt.

2.2.2. N_2O -CONCENTRATIEBEPALING

Voor de bepaling van de N_2O concentratie in de headspace, werd regelmatig een monster van 500 μ l genomen (gasspuit pressurelock type A2). Om te voorkomen dat in de flessen een onderdruk zou ontstaan werd steeds een gelijk volume Helium (1 atm.) terug gespoten. Onderdruk zou te lage waarden als uitkomst geven. Door een monster van 500 μ l volume, met een druk lager dan 1 atm. te nemen is de hoeveelheid gemonsterd gas afgenomen (Hoeveelheid = $c \times \text{volume} \times \text{partiële druk}$).

De concentratie N_2O in het gasmonster werd bepaald m.b.v. een gaschromatograaf (Packard 438A), uitgerust met een poropack Q en een ^{63}Ni electron capture detector (ECD). De flow van het dragergas "zuiver" N_2 was 30 ml/min, de oventemperatuur 50°C, de detectietemperatuur 280°C en de injectietemperatuur 75°C. Het ECD signaal werd geregistreerd op een penrecorder (servogor) en een integrator (HP).

De gaschromatograaf werd geijkt m.b.v. ijkasmengsels uit zuivere N_2O en zuivere N_2 (Hoekloos technisch N_2O 2.7 en zuiver N_2 4.5). Voor het ijken zijn 105 monsters ingespoten met

een bekende N_2O concentratie. De variatie in de uitkomsten bij dezelfde concentraties (steeds opnieuw gemengd) kan zijn ontstaan door:

- Variatie in inspuitsvolume van de ijkgasen in de gaschromatograaf.
- Variatie in registratie door de electroncapture detector.

Bij hoge concentraties lijkt de ijkcurve af te buigen (Fig. 4). Toch is gekozen voor een lineaire benadering van deze curve. Deze benadering gaat vooral goed op in het concentratiegebied waarin is gemeten. Voor hoge concentraties (> 20.000 integratoreenheden) is ook het laatste concentratiepunt opgenomen in een lineaire regressie. Zo ontstonden twee ijklijnen waaruit de N_2O concentraties konden worden berekend.

$$Y = 51672 \cdot X \text{ (6 } N_2O \text{ concentraties)}$$

$$Y = 46127 \cdot X \text{ (7 } N_2O \text{ concentraties)}$$

$$Y = \text{integratoreenheden}$$

$$X = N_2O \text{ in } \mu\text{mol} \cdot l^{-1}$$

Voor regressie is uitgegaan van de algemene vgl. $Y = a \cdot X$. De basislijn van de recorder was constant. Bij incubatie 8 is een andere ijklijn gebruikt, omdat na reparatie de g.c. weer opnieuw ingesteld moest worden. Deze ijklijn was berekend uit 6 punten. De vergelijking is $Y = 271 + 37440 \cdot X$ ($R = 0.990$).

Voor de omrekening van $[N_2O]$ in de headspace naar $[N_2O]$ in het suspensiewater is uitgegaan van waarden gevonden in de literatuur (WEISS & PRICE, 1980): $K(30\%, 20^\circ C) = 2.459 \cdot 10^{-2}$ en $K(30\%, 18^\circ C) = 2.613 \cdot 10^{-2}$. De daartussengelegen geïnterpoleerde waarden voor $19^\circ C$ is $2.569 \cdot 10^{-2}$. (de maximale fout door temperatuurverschil is 3%). De saliniteit van de Mokbaaimonsters lag in ieder geval tussen de 27‰ en 30‰. Daarom is uitgegaan van een saliniteit van 30‰. Dit lijkt een goede benadering, want de waarde van 27‰ is gemeten op 20-10-1985 toen er weinig wind was. Bij monstername voor de andere incubaties stond vaak een ZW-wind, zodat Noordzeewater het Marsdiep en ook de Mokbaai ingestuwd werd. Noordzeewater heeft een saliniteit van ong. 34‰.

Concentraties zijn weergegeven in $\mu\text{mol} \cdot l^{-1}$ of $\text{nmol} \cdot l^{-1}$. Productiesnelheden zijn uitgedrukt in $\text{nmol } N_2O \cdot h^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ nat sediment.

2.2.3. DE ZUURSTOFCONCENTRATIEBEPALING

Voor het bepalen van de zuurstofconcentratie zijn er verschillende mogelijkheden:

- electrode
- winklertitratie
- headspace techniek

Als eerste is gekeken naar de gebruiksmogelijkheden van elektroden. Micro-electroden bleven bij voorbaat buiten beschouwing omdat ze voor dit werk te kwetsbaar zijn. Wanneer bij meting een electrode van het type radiometer werd gebruikt, nam iedere keer bij opening van de fles de zuurstofspanning drastisch toe (tot $20 \mu\text{mol } O_2/l$). Om dit te voorkomen is zo'n electrode in een septumdop ingebouwd. De suspensie werd geschud met een roervlo (methode 1). Bij deze methode bleek de zuurstofconsumptie lineair af te nemen in de tijd (Fig. 5). De electrodemembraam beschadigde snel door mechanische verwerking (zie homogenisatie).

De zeer nauwkeurige winklertitratie kwam niet direct in aanmerking voor de incubatiemetingen. Voor iedere bepaling is minstens een 400 ml monster nodig, zodat regelmatig monsters onmogelijk is, en daarbij werken de sedimentdeeltjes storend op de bepaling.

Zo bleef als enig alternatief ook hier de headspace techniek over. Dankzij het kleine monstervolume is vervolgen van de concentratie wel mogelijk. De hier gebruikte techniek is geijkt m.b.v. de winklertitratie (CARRIT & CARPENTER, 1966).

De headspace techniek voor de zuurstof

De zuurstofconcentratie in de headspace werd bepaald door inspuiting van $200 \mu l$ headspace monster in een gaschromatograaf Packard 427 uitgerust met een TC-detector. De detectietemperatuur was $150^\circ C$, de injectietemperatuur $100^\circ C$ en de oventemperatuur $50^\circ C$. De gascomponenten werden gescheiden over twee kolommen: een 2.5 meter lange kolom molsieve 5A en een 2 meter lange kolom poropak N. Het dragergas was helium met een flowsnelheid van 30 ml per min .

De gaschromatograafwaarden die werden geregistreerd met een penrecorder zijn geijkt met winklertitraties. Een aantal serumflessen werden gevuld met water uit de Mokbaai. Vervolgens werden ze gedurende willekeurige tijd geflushed

met stikstofgas. Na instelling van het gasevenwicht werd tweemaal een monster in de gaschromatograaf gespoten. Hierna werd voorzichtig de dop verwijderd, en m.b.v. een herel een winklermonster genomen. Het monster werd direct gefixeerd. Het belang van gasevenwicht voor deze bepaling wordt duidelijk geïllustreerd in Fig. 6. Bij die bepalingen is gebruik gemaakt van homogenisatie-methode 3.

Om een idee te geven van de variatie in de headspacewaarden zijn twee willekeurige zuurstofconcentraties herhaaldelijk ingespoten. De variantie in deze bepalingen bedroeg resp. 2.7 en 4.1% (bij resp. 7 en 10 insputingen).

Met de gevonden ijklijn voor de zuurstofconcentraties in het water en de zuurstofconcentratie in de lucht, is de bunsencoëfficiënt te berekenen (in Fig. 7 is de ijklijn te zien). Uit de gevonden ijkvergelijking $Y = 0.0918 \cdot X$, volgt dat de zuurstofconcentratie bij een in water headspace van lucht, Y , gelijk is aan $232 \mu\text{mol/l}$. Lucht bevat 21% zuurstof, dus een liter lucht bevat 0.21 liter zuurstof. Dat is gedeeld door het molair volume (24 l bij 20°C) $8.75 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. De Bunsencoëfficiënt is dan:

$$B = \frac{\text{conc. O}_2 \text{ in suspensie}}{\text{conc. O}_2 \text{ in headspace}} = \frac{232 \cdot 10^{-6}}{8.75 \cdot 10^{-3}} = 0.0265$$

Gedurende de incubaties varieerde de temperatuur tussen 18 en 20°C . De saliniteit varieerde minstens tussen 27 en 30‰ . De bij de uiterste combinaties van temperatuur en saliniteit horende coëfficiënten staan in Tabel II (WEISS, 1970).

De waarde die hier precies middenin ligt is 0.0267. De uitersten wijken hier maximaal 2.8% vanaf. De gevonden waarde voor de bunsencoëfficiënt komt goed overeen met de literatuurwaarde en bevestigt de ijkingsprocedure.

2.3. HOMOGENISATIE

Het is voor de incubaties van groot belang dat in de suspensie een homogene toestand bestaat. De totale (gemeten) activiteit is een resultante van de deelactiviteiten van de afzonderlijke bacteriën. Wanneer deze totaalactiviteit gecorreleerd wordt aan milieuomstandigheden moet dus voor elke bacterie een vergelijkbaar milieu bestaan. Door goed schudden kan bereikt

worden dat het sediment in suspensie blijft, en tegelijk een goede (gas)uitwisseling tussen headspace en suspensie kan plaats vinden. Een aantal verschillende schudmethoden zijn uitgetest.

—Methode 1— (suspensie)

Een serumfles met roervlo wordt geplaatst op een magneetroerder. Met deze methode is het mogelijk sediment in suspensie te houden. Toch komt sedimentatie vaak voor. Een ander nadeel van deze methode is de sterke mechanische verwerking van zowel de roervlo als het sediment zelf. Na ongeveer 3 uur is al een toename in fijne sedimentdeeltjes te zien. Dit zou een beschadiging van een deel van de bacteriepopulatie kunnen indiceren. Met name van nitrificeerders want deze zijn gebonden aan het sediment (FENCHEL & BLACKBURN, 1978).

—Methode 2— (gasevenwicht)

De fles met inhoud wordt even (ong. 10 sec.) krachtig geschud. Daarna wordt de fles geruime tijd weggezet bij constante temperatuur. Zelfs na een dag heeft zich nog geen gasevenwicht ingesteld. Evenwichtinstelling door diffusie alleen gaat dus niet snel (zie zuurstofbepaling).

—Methode 3— (gasevenwicht)

De fles wordt ong. 2 min. krachtig geschud (ANDERSEN, 1984). Bij deze methode ontstaat gasevenwicht tussen headspace en suspensie.

—Methode 4— (suspensie/gasevenwicht)

De serumfles ligt horizontaal op een schudbak (50 omwentelingen per minuut). Na enkele minuten bestaat gasevenwicht. Het sediment bleef niet helemaal in suspensie. Op de bodem was steeds ongeveer 5% van de totale hoeveelheid sediment aanwezig. Deze hoeveelheid sediment was wel continu in beweging. Het is daarom niet zeker of hierin we het zelfde milieu geldt als in de rest van de suspensie. Er bestaat een kans dat er op de bodem anaerobe micropockets ontstaan.

—Methode 5— (suspensie/gasevenwicht)

De flessen worden gemonteerd op een verticaal ronddraaiende schijf. Deze schijf wordt aangedreven door een electromotor (Fig. 8). De draaisnelheid is 2 omwentelingen per minuut. Het sediment "valt" a.h.w. twee maal per minuut

door de waterfase. Tijd voor sedimentatie is er niet. Uit oogwaarneming blijkt dat de sedimentkorrels niet zichtbaar aggregaten vormen. De kans op anaerobe micropockets blijft natuurlijk aanwezig. De kans blijft echter tot een minimum beperkt.

2.4. NUTRIËNTENANALYSE

Bij enkele incubaties zijn watermonsters genomen voor analyse van NH_4 , NO_2 en NO_3 . Er werd steeds 3 ml. monster uit de fles getrokken m.b.v. een injectiespuit (5 ml.). Het monster werd direct gefiltreerd (0,2 μ , celluloseacetaat) en daarna geanalyseerd of ingevroren voor opslag. Na monsternamen werd 3 ml. Mokbaaiwater teruggespoten. Bij een aantal incubaties waren, voor fixatie, de monsters aangezuurd tot 1% HCL. Deze monsters werden steeds op 0°C gehouden. Deze fixatiemethode is niet goed omdat de uiteindelijke pH van de monsters varieerde tussen 3 en 5, en er dus geen sprake kon zijn van fixatie. Nieuwe monsters werden na deze ervaring direct geanalyseerd m.b.v. een autoanalyser. Voor nitraat en nitriet is uitgegaan van de methode beschreven door STRICKLAND & PARSONS (1968). Voor de analyse van NH_4 is uitgegaan van de methode beschreven door HELDER & DE VRIES (1979).

De uiteindelijke waarden zijn uitgedrukt in $\mu\text{mol/l}$. Deze concentraties gelden voor de waterfase van de suspensie.

2.5. SEDIMENTDICHTHEID

Om productie- en consumptiesnelheden uit te kunnen drukken per cm^3 sediment is de dichtheid van Mokbaaisediment bepaald. Drie sedimentcores met bekend volume zijn natgewogen. Het gewicht is ook bepaald na 24 uur verwarming (60°C). De resultaten staan in Tabel III. Bij de berekening is uitgegaan van een gemiddeld natgewicht van 2.01 gram voor een cm^3 sediment.

3. RESULTATEN

Alle incubaties zijn op overeenkomstige manier ingezet. Karakteristieke gegevens van de afzonderlijke incubaties zijn getabelleerd in Tabel IV. Aan de hand van de incubaties 1 & 8 wordt het verloop van een incubatie beschreven. Vervolgens wordt m.b.v. de overzichtstabel ingegaan

op de resultaten van de verschillende incubaties. De afzonderlijke bepalingen staan per incubatie getabelleerd in bijlage I.

3.1. BESPREKING VAN TWEE INCUBATIES

Op 5 november 1985 werd bij laagwater een sediment en een watermonster genomen. Twee uur na inzetten van de incubatie werden de eerste gasmonsters genomen. Er is namelijk tijd nodig om de incubatiefles op temperatuur te laten komen. De N_2O concentratie was 15.4 nmol/l en de O_2 concentratie 161.2 $\mu\text{mol/l}$ (Fig. 6). De N_2O concentratie bleef gedurende 21 uur gelijk, terwijl de O_2 concentratie zakte tot 25.5 $\mu\text{mol/l}$. De drie daarop volgende uren klom de N_2O concentratie op naar een maximum van 1600 nmol/l . Hierna zakte deze concentratie binnen een uur naar 2 $\text{nmol N}_2\text{O/l}$. De O_2 concentratie bij het N_2O maximum was 14.7 $\mu\text{mol/l}$ en op het eind 10.9 $\mu\text{mol/l}$. Het N_2O maximum werd gemeten na 25 uur incubatietijd. De tijd van accumulatie was 10 uur. De maximaal gemeten accumulatie- en afname snelheden bedroegen resp. 8.9 en 14.6 $\text{nmol/cm}^3\text{h}$.

Tijdens incubatie 8 zijn behalve N_2O - en O_2 bepalingen ook de hoeveelheden nitraat en nitriet bepaald. De gegevens staan in Fig. 10. De incubatie is na kort N_2 flushen ingezet. De beginwaarde voor zuurstof was 25 $\mu\text{mol/l}$. Na ruim een uur kwam de N_2O productie op gang. Deze accumulatie duurde 15 uur en bereikte een maximum van 480 $\text{nmol N}_2\text{O/l}$. De zuurstofconcentratie op dat moment was 11.2 $\mu\text{mol O}_2\text{/l}$. Na de accumulatie werd binnen 6 uur alle N_2O geconsumeerd. De nitrietconcentratie is gedurende de N_2O accumulatie eerst constant gebleven (ong. 5 $\mu\text{mol NO}_2\text{/l}$). Bij het N_2O Maximum verdubbelde de nitrietconcentratie zich. Hierna werd binnen dezelfde 6 uur de nitrietconcentratie gereduceerd tot 0.2 $\mu\text{mol NO}_2\text{/l}$. Nitraat laat hetzelfde verloop zien als nitriet. De fluctuerende waarde vóór het maximum was ong. 30 $\mu\text{mol NO}_3\text{/l}$. Op tijdstip $t = 24 \text{ h}$ is 2ml. 10 mM NO_3 toegevoegd. Het effect hiervan was een momentane hernieuwde productie van nitriet en lachgas. De nitraatconcentratie nam af. De afname van nitraat per tijdseenheid was niet gelijk aan de gezamenlijke toename van nitriet en lachgas.

3.2. OVERZICHT VAN DE INCUBATIES

De incubaties in de overzichtstabel zijn gerang-

schikt naar soort sediment en aard van de headspace. De afzonderlijke incubaties staan in bijlage I. Opvallend in de tabel is dat er in 7 van de 9 incubaties met Mokbaaisediment, N_2O accumulatie heeft plaatsgevonden. Monsters uit de wadbak laten geen accumulatie zien. De maximale N_2O waarden liggen tussen 160 en 1640 nmol/l. De maximale accumulatie snelheid was 10 nmol/cm³.h, de maximale afname snelheid 30 nmol/cm³.h. De incubatietijd waarvoor de hoogste N_2O concentraties werden gemeten zijn voor iedere incubatie verschillend. Wel valt op dat deze waarden bij N_2 -geflusde headspaces lager liggen dan bij de lucht-geflusde headspaces.

De start van N_2O accumulatie is gesteld bij die concentratie waarvoor geldt $[N_2O]t + 1 = [N_2O]t + 20\% [N_2O]t$. De zuurstofconcentraties die bij deze waarden horen liggen dicht bij elkaar. Alleen die incubaties die verlopen zijn zonder tussentijdse O_2 concentratiestijgingen en die incubaties waarbij de zuurstofconcentratie niet op een hoog niveau bleef hangen (als gevolg van het opraken van org. koolstof) zijn hier vergeleken. Een andere voorwaarde was dat de beginwaarde voor zuurstof groter was dan 20 $\mu\text{mol/l}$. In totaal zijn dit zes Mokbaai-incubaties. De waarden zijn: 25.5, 26.1, 41.3, 22.9, 25 en 21.8 $\mu\text{mol } O_2/\text{l}$. De gemiddelde waarde is 27.1 $\mu\text{mol/l}$, de standaardafwijking: 26%. Het 95% betrouwbaarheidsinterval is van 19.9 tot 34.3 $\mu\text{mol } O_2/\text{l}$ (t-toets).

Voor de top van de N_2O accumulatie is ook gekeken naar de bijbehorende zuurstofconcentraties. Voor vijf incubaties konden die waarden bepaald worden. Het gemiddelde (van 14.7, 10.9, 15.3, 4.4, 11.2) is 11.3 $\mu\text{mol } O_2/\text{l}$. De standaardafwijking bedraagt 38% en het 95% betrouwbaarheidsinterval is van 6.2 tot 16.3 $\mu\text{mol } O_2/\text{l}$.

Voor alle geselecteerde incubaties samen is een gecombineerde grafiek gemaakt van N_2O concentraties met bijbehorende O_2 concentraties. (Fig. 11) De hoogste waarde ligt uiteraard weer bij 1600 nmol N_2O/l . In het zuurstofbereik van 0 tot ong. 15 $\mu\text{mol/l}$ lijkt de N_2O concentratie toe te nemen. van 15 tot 50 $\mu\text{mol/l}$ neemt de concentratie af tot de atmosferische waarde. Bij zuurstof concentraties hoger dan 50 $\mu\text{mol/l}$ blijft de waarde constant.

Uit de afzonderlijke incubaties zijn N_2O accumulatie snelheden berekend volgens:

$$d N_2O/dt = \frac{[N_2O](t+1) - [N_2O]t}{t+1-1} \cdot \frac{\text{sed. dichtheid}}{\text{nat gewicht sed.}}$$

Deze productiesnelheden met bijbehorende zuurstofconcentraties zijn afgebeeld in Fig. 12. Bij concentraties groter dan ong. 30 $\mu\text{mol } O_2/\text{l}$ treedt geen productie of consumptie op. Beneden deze concentratie treedt zowel N_2O accumulatie als afname op.

4. DISCUSSIE

4.1. N_2O ACCUMULATIE

De accumulatie van N_2O , die in een groot aantal van de incubaties optreedt, kan gezien het schema in Fig. 1 uit nitrificatie, denitrificatie of uit beide processen samen afkomstig zijn. Theoretisch bestaan de volgende mogelijkheden (Fig. 13):

1) Accumulatie vanuit nitrificatie zou kunnen ontstaan bij die zuurstofconcentraties, waarbij oxydatie van N_2O naar NO_2 en NO_3 wordt geïnhibeed. Deze concentratie moet tevens hoog genoeg zijn voor volledige inhibitie van denitrificatie.

2) Wanneer de denitrificatie niet verder verloopt dan tot N_2O , is de zuurstofconcentratie hoog genoeg voor inhibitie N_2O reduce tot N_2 i.a. sw O_2 concentratie daarbij laag genoeg voor inhibitie van nitrificatie, dan zal N_2O accumulatie vanuit denitrificatie optreden.

3) Het is ook mogelijk dat er een zuurstof-range bestaat waarbij N_2O reductie tot N_2 wordt geïnhibeed maar oxydatie van NH_4 tot N_2O nog plaatsvindt. In dit geval zou N_2O vanuit beide processen geproduceerd kunnen worden.

Uit de resultaten blijkt dat bij afnemende O_2 concentratie éénmaal N_2O accumulatie optreedt. Gezien bovenstaande mogelijkheden, zijn hier twee verklaringen voor. Wanneer de redeneringen van punt één en twee gelden moet een van de twee verwachte accumulaties niet meetbaar geweest zijn. Een meer voor de hand liggende verklaring is die van punt drie. De zuurstof-range is in dit onderzoek bepaald tussen 0 en 28 $\mu\text{mol } O_2/\text{l}$.

4.2. N₂O AFNAME

Bij alle incubaties waarin N₂O accumulatie plaats vond, werd deze gevolgd door N₂O afname. Dit betekent dat de N₂O productie op dat moment kleiner is dan de N₂O consumptie. Dit kan twee verschillende oorzaken hebben:

1) De consumptie van N₂O is toegenomen. Dit zou kunnen door toenemende oxydatie van N₂O naar NO₂. Deze mogelijkheid is niet waarschijnlijk doordat NO₂ in deze omstandigheden weer tot N₂O gereduceerd wordt. N₂O afname is dan niet het netto effect. Een toenemende reductie van N₂O naar N₂ zou wel toenemende N₂O consumptie kunnen veroorzaken. Wellicht is de zuurstofwaarde van 11.3 µmol/l wel de startwaarde voor verhoogde reductie.

2) Een andere oorzaak voor N₂O afname zou de vermindering in N₂O productie kunnen zijn. Vermindering van N₂O productie vanuit ammonium door inhibitie van zuurstof zou hierin een rol kunnen spelen. De N₂O productie uit nitraat zou geïnhibereerd kunnen zijn door limitatie van nitraat. De twee argumenten hangen samen doordat nitrificatie de nitraat voor denitrificatie produceert (tenzij er overmaat aan nitraat is in het milieu). De waarde 11.3 µmol O₂/l zou in dit geval de grens voor oxydatie van nitriet of zelfs ammonium kunnen weergeven.

In incubatie 8 was de NO₃ concentratie aan het begin 30 µmol/l. Deze concentratie bleef nagenoeg constant tijdens N₂O accumulatie. Bij N₂O afname nam ook de hoeveelheid nitraat af. Terugbrengen van de nitraat concentratie tot 30 µmol/l gaf momentane N₂O productie. Deze proef geeft een sterke indicatie voor verminderde N₂O productie vanwege nitraatlimitatie. De grootte van de hernieuwde N₂O productie geeft ook de indruk dat denitrificatie de N₂O product is op dat moment.

Een andere aanwijzing voor mogelijkheid twee is dat anaeroob ingezette incubaties ook accumulatie van N₂O te zien geven. Dit betekent dat beneden 11.3 µmol O₂/l de productie snelheid van N₂O de consumptie overtreft. De eventueel verhoogde N₂O reductie is dus niet zo groot dat deze altijd de N₂O productie overtreft.

De NO₃ concentratie waar beneden de N₂O productie afhankelijk lijkt te zijn van de hoeveelheid nitraat (25 µmol/l), komt goed overeen met eerder gevonden soortgelijke waarnemingen van 21.7 en 15 µmol/l (ANGELIS & GORDON, 1985; JEN-

SEN, 1984). In batchcultures van sediment uit een Deens estuarium werd een continu stijgende N₂O productie gevonden bij steeds lagere zuurstofconcentraties. De nitraatconcentratie werd hierbij constant 100 µmol/l gehouden (Jørgensen, 1984).

4.3. PRODUCTIESNELHEID VAN N₂O

De hier bepaalde accumulatie snelheden zijn moeilijk te vergelijken met de natuurlijke situatie. OREMLAND (1984) vond bij incubaties van slurries en intacte cores totaal verschillende productiewaarden, resp. 0.8-1.2 en 17-280 µmol N₂/cm³*h. Metingen van intact sediment moeten ook wel lager uitkomen. De maximale waarden die hier gemeten zijn, zijn bepaald onder extra gunstige omstandigheden voor N₂O productie (homogenisatie). Deze waarden moeten dan ook gezien worden als metingen van potentiële activiteit. In het intacte sediment bevinden zich maar minuscule gebiedjes met die gunstige omstandigheden. De hoogste waarde van 21.8 nmol/cm³*h is dan ook hoog vergeleken met enkele waarden in Tabel V.

4.4. MODEL

Gezien de resultaten en de verschillende mogelijkheden voor N₂O productie en consumptie, zou een volgend model voor de incubaties kunnen gelden.

In suspensie met voldoende zuurstof treedt geen N₂O accumulatie op doordat de nitrificatie volledig verloopt en de denitrificatie helemaal niet. In dit geval treedt wel accumulatie van nitraat op.

Bij afnemende zuurstofconcentratie verloopt de nitrificatie steeds minder volledig, er kan nu naast nitraat ook nitriet en lachgas ontstaan. De denitrificatie begint nu op gang te komen en nitraat gevormd uit nitrificatie wordt omgezet in nitriet en N₂O.

Wanneer de zuurstofconcentratie zover gedaald is dat nitrificatie niet verder meer verloopt dan tot N₂O, gaat accumulatie vanuit beide processen plaatsvinden.

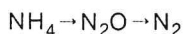
Nog lagere zuurstofconcentraties inhiberen de nitrificatie nu volledig. N₂O accumuleert nu alleen vanuit de bestaande "nitraat-pool". De inmiddels steeds minder geïnhibeerde reductie van N₂O tot N₂ is kleiner dan de N₂O productie uit nitraat.

Na verloop van tijd is de nitraathoeveelheid limiterend geworden voor de N_2O productie. De N_2O reductie is nu in verhouding groter en N_2O wordt geconsumeerd, wat resulteert in N_2O afname.

Uit N_2O profielen gemeten in Denemarken blijkt dat in sedimenten vaak een maximum N_2O concentratie zich bevindt tussen 6 en 9 cm (SØRENSEN, 1979). Toenemende productie van N_2O bij afnemende zuurstof concentratie zoals die in sediment suspensie werd gevonden door JØRGENSEN & SØRENSEN (1984) komt in het sediment niet voor. Vermoedelijk wordt N_2O productie in sediment door zowel zuurstof als beschikbaarheid van nitraat gereguleerd. Wellicht is het beeld wat gevonden wordt in de tijd bij de incubaties een afspiegeling van dat wat zich in de verticaal van het sediment afspeelt.

4.5. CONSEQUENTIES

In bovenstaand model wordt de mogelijkheid geopperd dat N_2O uit nitrificatie ontstaat maar niet verder oxydeert tot nitriet. Wanneer onder diezelfde omstandigheden reductie van N_2O tot N_2 zou kunnen plaatsvinden, is sprake van de route:



Wanneer deze laatste omzetting niet gelijktijdig plaatsvindt kan N_2O terecht komen op plaatsen met lage zuurstofconcentraties. Dit betekent in de ruimte gescheiden deelprocessen.

De nieuwe route werd al voorgesteld als energetisch mogelijk door FENCHEL & BLACKBURN (1978). CODISPOTI (1985) vond in het upwelling gebied bij Peru ook al aanwijzingen in deze richting.

Uit de resultaten in dit onderzoek is niet duidelijk of reductie van N_2O tot N_2 naast productie van N_2O uit nitrificatie plaats vindt. Om dit te onderzoeken is het volgende experiment uitgevoerd. Bij de incubaties 6 en 7 is $15NH_4$ toegevoegd op het moment dat N_2O begon te accumuleren. Hierna zijn regelmatig monsters genomen om met de massaspectrometer eventuele $15N_2$ verrijking te meten. Deze verrijking werd niet gevonden. Dit kan twee oorzaken hebben.

—de "nieuwe" route bestaat niet
—de tijd waarin de mogelijkheid bestond om $15N_2$ uit $15NH_4$ te produceren was te kort om een meetbare verrijking te veroorzaken

Een experiment waarbij geruime tijd de

zuurstofconcentratie tussen 11.3 en 28 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ kan worden gehouden zou wellicht antwoord kunnen geven op de vraag of de route werkelijk bestaat.

Mocht dit zo zijn dan heeft dit vergaande gevolgen voor snelheidsbepalingen van nitrificatie en denitrificatie die in het verleden gedaan zijn. Nitrificatie-processen die gekwantificeerd zijn door bepalingen van ammonium afname geven een overschatting bij voorspelling voor nitraat-productie. Ook denitrificatie bepaald aan de hand van N_2 productie zou overschat kunnen zijn.

Hoe het ook zij, een gedegen onderzoek naar deze N_2 en N_2O productie vanuit ammonium is hard nodig.

5. LITERATUUR

- ANGELIS, M.A. & L.I. GORDON, 1985. Upwelling and river runoff as sources of dissolved nitrous oxide to the Alesia estuary, Oregon.—*Estuar. coast. mar. Sci.* **20**: 375-386
- ANDERSON, T.K., M.H. JENSEN & J. SØRENSEN, 1984. Diurnal variation of nitrogen cycling in coastal, marine sediments. I. Denitrification.—*Mar. biol.* **83**: 171-176
- BILLEN, G., 1975. Nitrification in the Scheldt estuary (Belgium and The Netherlands).—*Estuar. coast. mar. Sci.* **3**: 79-89
- , 1978. A budget of nitrogen recycling in North Sea sediments of the Belgian coast.—*Estuar. coast. mar. Sci.* **7**: 127-246
- BRODA, E., 1975 b. The history of inorganic nitrogen in the biosphere.—*J. Mol. Evol.* **7**: 87-100
- CAMPELL, N.E.R. & H. LEES, 1967. The nitrogen cycle. In: A.D. MCLAREN & G.H. PETERSEN. *Soil biochemistry*. M. Dekker, New York. 194-215.
- CARCEY, C.L., 1937. The occurrence and distribution of nitrifying bacteria in the sea.—*J. Mar. Res.* **1**: 349-350
- CARITT, D.E. & J.H. CARPENTER, 1966. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method of determining dissolved oxygen in seawater; a NASCO report.—*J. Mar. Res.* **24**: 284-318
- CODISPOTI, L.A. & J.P. CRISTENSON, 1985. Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the eastern tropical South Pacific Ocean.—*Mar. chem.* **16**: 277-300
- DELWICHE, C.C., 1970. The nitrogen cycle.—*Sci. Amer.* **223**: 136-146
- DELWICHE C.C. & ? BRYAN, 1976. Denitrification.—*Ann. Rev. Microbiol.* **30**: 241-262
- FENCHEL, T. & T.H. BLACKBURN, 1978. The nitrogen cycle.—*Bacteria and mineral cycling*. chapter 5
- FIRESTONE, M.K. & J.M. TIEDJE, 1979. Temporal change

- in nitrous oxide and denitrification following onset of anaerobiosis.—Appl. Environ. Microbiol. Oct.: 673-679
- FROELICH, P. *et al.*, 1972. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis.—Geochim. cosmochim. **43**: 1075-1090.
- GOREAU, T.J., W.A. KAPLAN, S.C. WOLFSY, M.B. McELROY, F.W. VALOIS & S.W. WATSON, 1980. Production of NO_2 and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen.—App. Environ. Microbiol. Sept.: 526-532
- HATTORI, A., 1983. Denitrification and dissimilatory nitrate reduction.—Nitrogen in the marine environment chap. 6 (Carpenter & Capone).
- HELDER, W. & R.T.P. DE VRIES, 1979. An automatic phenol-hypochlorite method for studying geochemistry of sediment water interface.—Ambio. **1**: 71-73. **13**: 154-160
- , 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria.—Neth. J. Sea Res. **17**: 1-18
- HOCHSTEIN, L.I., M. BETLACH & G. KRITIKOS, 1984. The effect of oxygen on denitrification during steady-state growth of *Paracoccus Denitrificans*.—Arch. Microbiol. **137**: 74-78
- JENSEN, H.B., K.S. JØRGENSEN & J. SØRENSEN, 1984. Diurnal variation of nitrogen cycling in coastal, marine sediments II. Nitrous oxide emission.—Mar. Biol. **83**: 177-183
- JOHN, P., 1977. Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes.—J. Gen. Microbiol. **98**: 231-238
- JØRGENSEN, K.S., H.B. JENSEN & J. SØRENSEN, 1984. Nitrous oxide production from nitrification and denitrification in marine sediment at low oxygen concentrations.—Can. J. Microbiol. **30**: 10
- KAPLAN, W.A., 1983. Nitrification.—Nitrogen in the marine environment. chap.5 (Carpenter & Chapone).
- LIU, K.K. & I.R. KAPLAN, 1972. Nitrous oxide in the sea off southern California. chap.4
- McELROY, M.B., 1983. Marine biological controls on atmospheric CO_2 and climate.—Nature **302**: 328
- OREMLAND, R.S., C. UMBERGER, C.W. CUHBERTSON & R.T. SMITH, 1984. Denitrification in San Francisco Bay intertidal sediments.—Appl. Environ. Microbiol. May: 1106-1112
- PAINTER, H.A., 1970. A review of the literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms.—Water. Res. **4**: 393-450
- POTH, M. & D.D. FOCHT, 1985. ^{15}N analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification.—Appl. Environ. Microbiol. **49**: 1134-1141
- RAYENDRAN, A. & V.K. VENUGOPALAN, 1976. Hydroxylamine formation in laboratory experiments on marine nitrification.—Mar. Chem. **4**: 93-98
- ROBERTSON, L.A. & J.G. KUENEN, 1984. Aerobic denitrification—old wine in new bottles?—Anth. Leeuw. **50**: 525-544
- RUTGERS VAN DER LOEFF, M.M., F.B. ELS, W. HELDER & R.P.T. DE VRIES, 1981. Sediment water exchanges of nutrients and oxygen on tidal flats in the Ems-Dollard estuary.—Neth. J. Sea Res. **15**: 113-129
- STRICKLAND, J.D.H. & T.R. PARSONS, 1968. A practical handbook of Sea water analysis.—Bull. Fish. Res. Bd. Can. **167**: 1-311
- SØRENSEN, J., 1978. Occurrence of nitric and nitrous oxides in a coastal marine sediment.—Appl. Environ. Microbiol. Dec.: 809-813
- WEISS, R.F., 1970. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and sea water.—Deep Sea Res. **17**: 721-735
- WEISS, R.F. & B.A. PRICE, 1980. Nitrous oxide solubility in water and sea water.—Mar. Chem. **8**: 347-359
- YOH, M., H. TERAI & Y. SAIJO, 1983. Accumulation of nitrous oxide in the oxygen deficient layer of freshwater lakes.—Nature **301**: 327-?

BIJLAGE I. DE AFZONDERLIJKE INCUBATIES.

Meetserie 1: 05/11/85

tijd hours	[O ₂] umol/l	[N ₂ O] nmol/l	dN ₂ O/dt nmol/cm ³ *h
.00			
2.00	161.19	15.363	.003
2.58	152.47	16.501	.017
5.92	123.07	14.794	-.005
6.92	116.53	15.363	.005
7.83	110.00	15.363	.000
9.00	103.46	15.363	.000
10.83	91.48	15.363	.000
11.92	86.04	15.363	.000
12.92	81.68	15.363	.000
13.83	84.95	17.070	.017
14.42	81.68	17.639	.009
15.42	64.26	15.363	-.020
21.42	25.50	31.864	.025
22.42		89.902	.517
22.92	17.43	239.833	2.673
23.33	15.79	646.896	8.851
24.67	14.70	1643.044	6.627
25.17	16.88	1231.031	-7.346
25.67	14.16	410.135	-14.636
26.17	13.61	35.278	-6.684
26.67	11.98	2.959	-.576
27.58	10.89	2.959	.000
28.02	10.89	2.219	-.015
28.58	10.89	2.219	.000
29.00	10.89	2.219	.000
31.75	10.89	2.219	.000

Meetserie 3: 11/11/85

time hour	[O ₂] umol/l	[N ₂ O] nmol/l	dN ₂ O/dt nmol/cm ³ .h
.00	265.97		
.80	212.38	10.299	-.004
6.50	177.52	10.982	.001
16.92	133.96	11.039	.000
19.17	132.87	19.232	.034
20.25	133.96	19.858	.005
22.17	115.44	58.550	.187
23.17	106.73	47.682	-.101
24.33	105.64	26.288	-.171
25.17	94.75	22.305	-.044
26.17	89.31	18.265	-.038
29.33	75.15	31.864	.040
30.25	68.61	43.415	.117
31.25	65.35	33.742	-.090
33.00	58.81	41.708	.042
34.00	55.54	32.205	-.088
35.00	55.54	45.634	.125
36.00	51.19	46.089	.004
37.00	50.10	44.496	-.015
38.00	46.83	58.152	.127
39.00	45.74	61.168	.028
40.00	33.76	63.614	.023
42.00		72.548	.041
43.17	43.56	65.833	-.053
44.12	41.39	67.597	.017
45.03	39.21	89.333	.222
45.70			
46.32	39.21	92.462	.023
47.08	28.31	80.286	-.149
49.10	32.67	98.778	.085
56.53	15.25	159.889	.076
67.27	11.98	.000	-.138

Meetserie 2 05/11/85

tijd hour	[O ₂] umol/l	[N ₂ O] nmol/l	dN ₂ O/dt nmol/cm ³ *h
.00	191.68		
1.25	175.35	13.087	.021
4.33	153.56	12.290	-.003
5.42	149.21	11.095	-.014
6.25	144.85	11.380	.004
7.42	137.23	7.283	-.044
9.25	130.69	11.665	.030
10.33	125.25	11.665	.000
11.33	119.80	10.982	-.009
12.25	117.62	11.323	.005
12.83	114.36	10.071	-.027
13.83	112.18	12.006	.024
19.83	81.68	12.120	.000
20.83	75.15	11.209	-.012
21.83	66.98	15.249	.051
22.42		16.103	.018
23.25	55.54	15.249	-.013
23.75	50.64	18.606	.085
24.25	40.84	20.598	.050
24.75	41.93	20.655	.001
25.25	37.03	21.053	.010
26.00	29.95	23.614	.043
26.50	26.14	23.898	.007
27.00	22.33	29.076	.131
27.42	19.06	36.188	.214
27.92		42.618	.163
28.00	11.98		
28.50	11.44	61.509	.412
29.50	10.89	875.065	10.292
30.17	10.89	1035.580	3.031
30.58	11.44	55.534	-30.240
31.08		2.276	-1.348

Meetserie 4 : 26/11/86

time hour	[O ₂] umol/l.	[N ₂ O] nmol/l.	dN ₂ O/dt nmol/cm ³ *h
.00	219.99		
2.42	198.22	17.070	.066
4.08	188.41	16.160	-.005
8.00	177.52	20.313	.010
19.17	136.14	20.313	.000
22.50	109.99	13.542	-.019
25.92	91.48	22.703	.025
27.33	81.68	20.655	-.014
32.75	56.63	24.865	.007
34.25	58.81	26.572	.011
41.67	34.85	29.873	.004
44.75	28.32	32.205	.007
47.75	21.78	30.214	-.006

Meetserie 5 : 26/11/85

time hour	[O2] umol/l.	[N2O] nmol/l.	dN2O/dt nmol/cm3*h
.00	220.00		
2.50	202.57		
4.00	190.59	14.225	.018
8.08	184.06	18.549	.013
19.25	143.76	19.801	.001
22.42	127.43	20.029	.001
25.83	107.82	17.867	-.008
27.58	106.73	22.191	.030
32.92	99.11	20.313	-.004
34.25	90.40	22.931	.024
41.67	77.33	25.093	.004
44.75	80.59	27.255	.009
47.75	66.44	28.962	.007
51.00	60.99	32.945	.015
54.83	56.63	25.605	-.023
58.25	35.94	30.043	.016

Meetserie 6 : 03/12/85

time hour	[O2] umol/l.	[N2O] nmol/l.	dN2O/dt nmol/cm3*h
2.17	37.03		
2.73	26.14	52.348	-.431
3.88	22.87	37.554	-.116
4.95	14.16	36.302	-.011
5.92	8.71	19.858	-.153
6.95	4.36	50.072	.265
7.78		82.505	.352
8.53	3.27	313.519	2.778
9.53	2.72	517.847	1.843
10.70			
11.53	3.27	441.146	-.346
12.78	2.18	1.422	-3.173

Meetserie 7 : 03/11/85

time hour	[O2] umol/l.	[N2O] nmol/l.	dN2O/dt nmol/cm3*h
2.08	51.52	47.398	.201
3.20	42.48		
3.63	42.48	40.001	-.046
4.12	38.12	36.928	-.060
5.17	31.58	28.848	-.0740
6.12	26.14	26.402	-.0250
7.20	22.87	21.622	-.043
8.03	14.16	80.570	.683
8.78	18.51	92.007	.147
9.78	16.14	88.366	-.035
10.78	9.80	54.738	-.323
12.03	5.45	120.799	.508
14.22	4.36	247.515	.556

Meetserie 9: 28/10/85

tijd hour	O2 umol/l.	[N2O] nmol/l.	dN2O/dt nmol/cm3*h
.00	9.80		
1.50	3.27		
2.50	2.18	33.116	.142
3.50		92.804	.938
4.50	1.09	207.116	1.796
5.50		288.312	1.275
6.50		286.890	-.022
7.50		131.439	-2.442
8.50		27.369	-1.635
9.33		1.366	-.492
16.83		.626	-.002
20.67			
24.42			
27.08			
43.25			

Meetserie 8 : 22/01/86

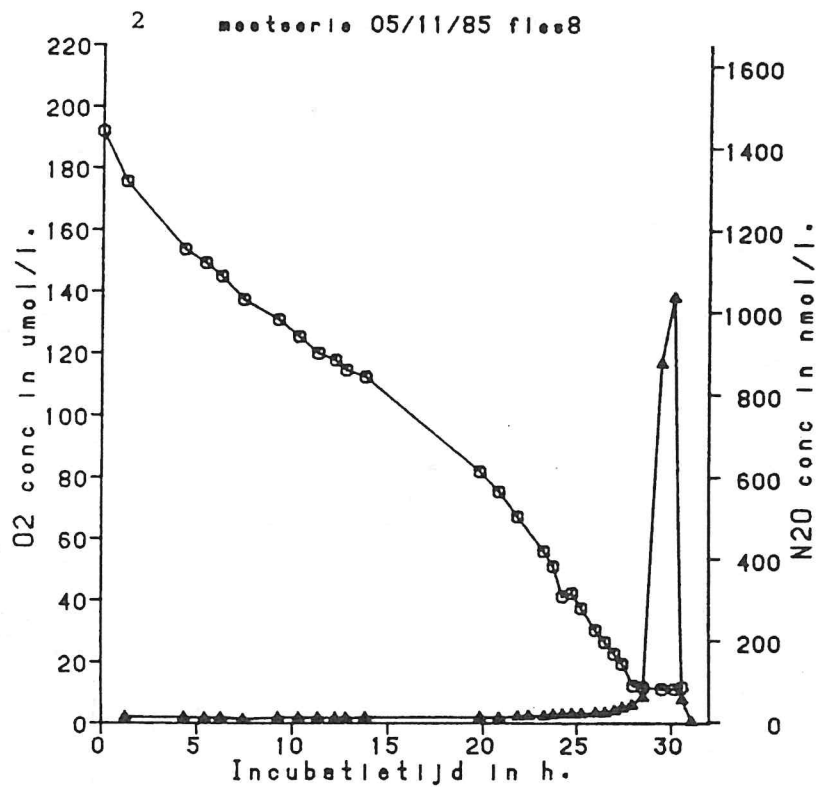
time hours	[O2] umol/l.	[N2O] nmol/l.	dN2O/dt nmol/cm3*h	[NO2] umol/l.	dNO2/dt nmol/cm3*h	[NO3] umol/l.	dNO3/dt umol/l*h
1.68	25.00						
2.93		.000	.000	4.400	2.370	33.100	.008
4.18		.441	.004				
6.07				4.700	.472	41.300	.013
7.43		17.026	.053	5.400	2.542	32.600	-.032
9.02	16.00	37.523	.134				
11.10	22.00	150.974	.565	5.400	.000	32.600	.000
13.35	10.00	343.108	.885	4.200	-2.634	27.800	-.011
14.35	11.20	345.532	.025				
15.10		388.841	.598	3.900	-.847	32.100	.012
16.20		479.480	.854	8.500	20.651	59.500	.123
17.10		352.585	-1.461	1.600	-37.860	16.400	-.236
18.77		264.370	-.547	1.400	-.591	7.600	-.026
20.27		191.307	-.505	1.800	1.317		
21.52		10.634	-1.497				
22.02	6.40	.000	-.220	.700	-3.104	2.300	-.008
24.02				.200	-1.235	32.800	.075
24.55		58.737	.241	.800	5.591	29.200	-.034
25.52		197.148	1.478	1.200	2.036	23.800	-.027
26.68		215.165	.161	1.500	1.277	21.500	-.010

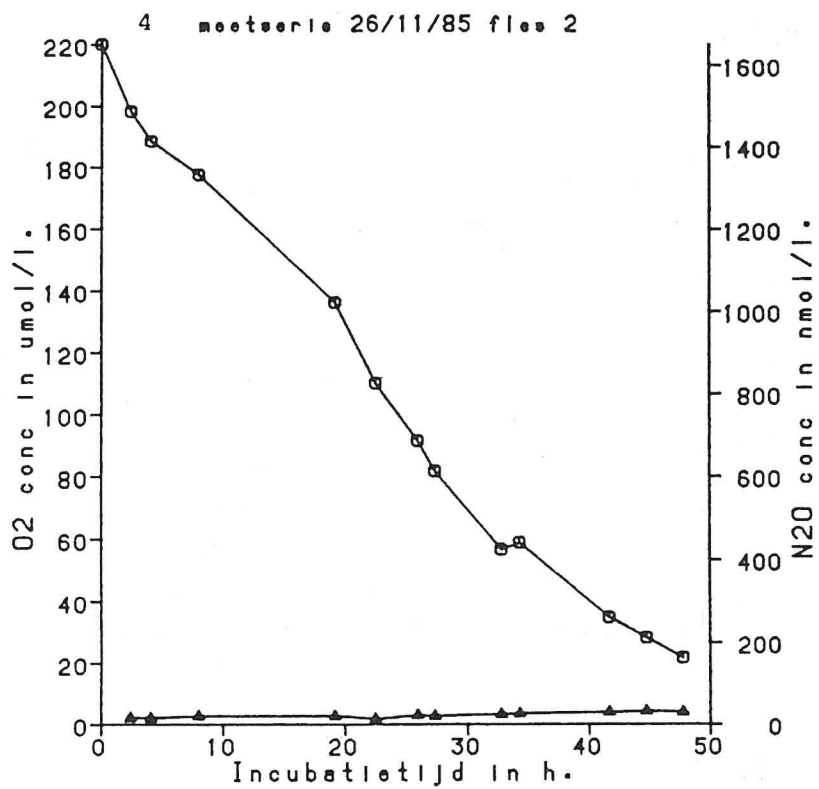
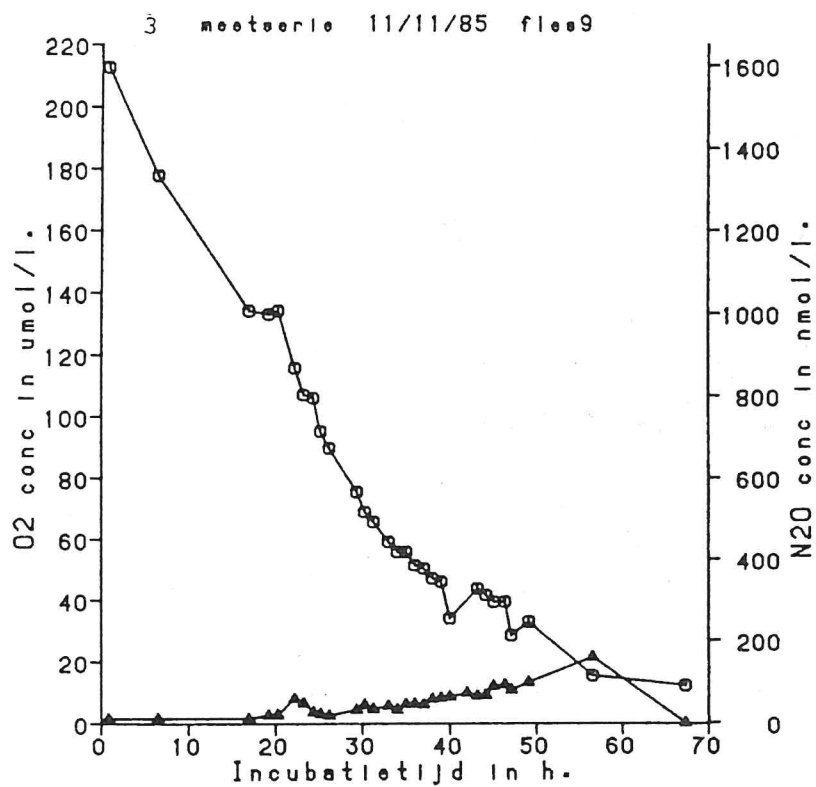
Meetserie 10 : 19/11/85

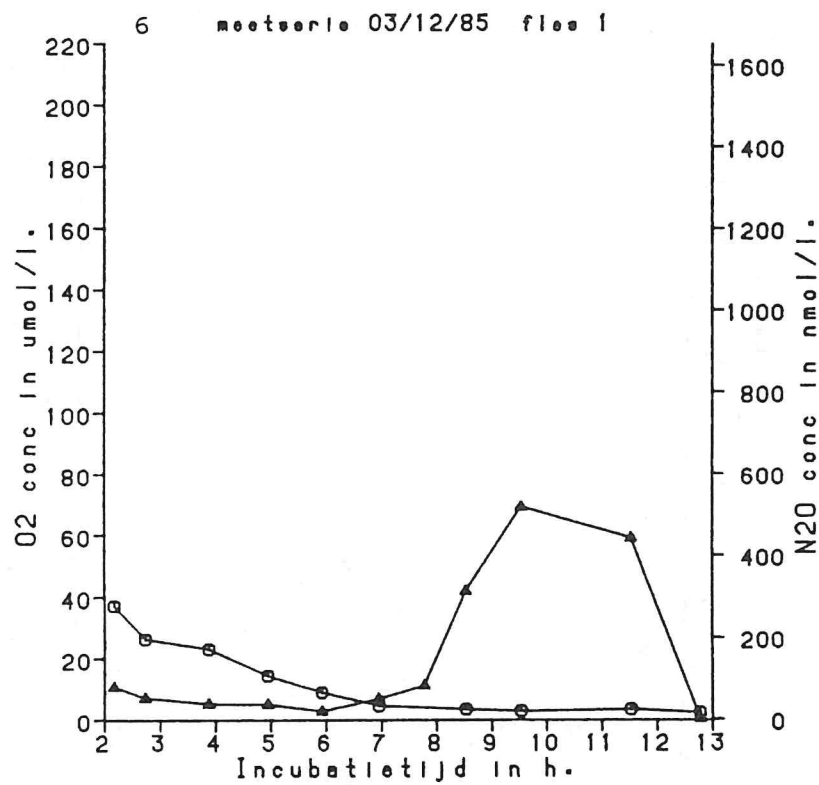
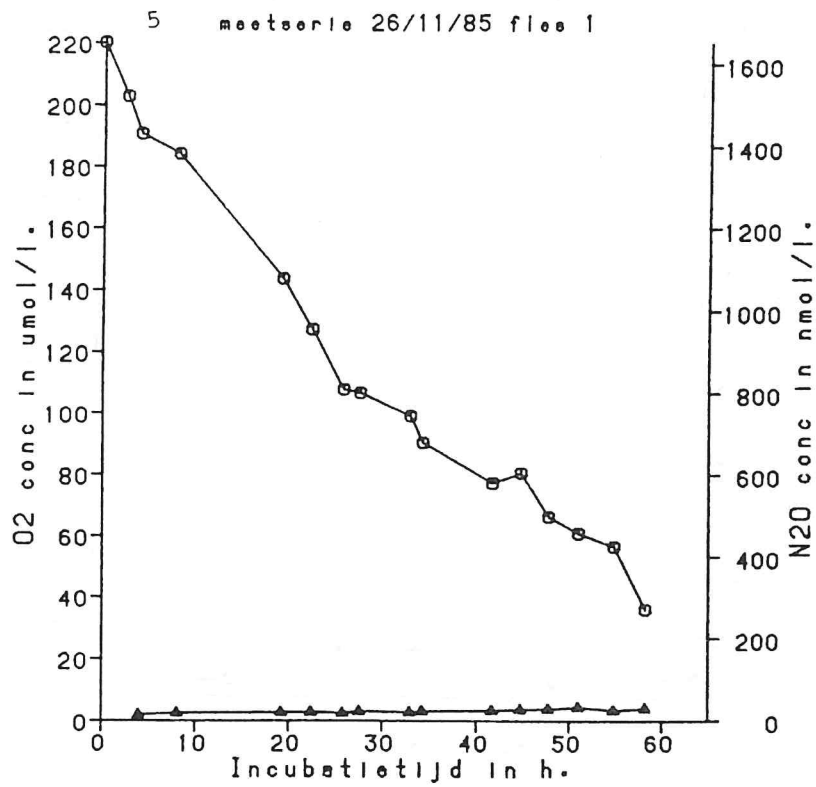
time hour	[O ₂] umol/l.	[N ₂ O] nmol/l.	dN ₂ O/dt nmol/cm ³ *h
.00	179.70		
.50	114.36	13.485	.080
.90	100.20	12.575	-.042
1.42	67.52	14.965	.085
1.92	56.63	8.421	-.242
2.50	37.03		
3.00	35.94	10.299	.032
3.50	23.96	14.965	.173
4.00		15.648	.025
4.67	17.43		
5.17	15.25		
5.73	14.16	31.181	.166
6.08	16.34	29.190	-.105
6.58	15.25	22.703	-.240

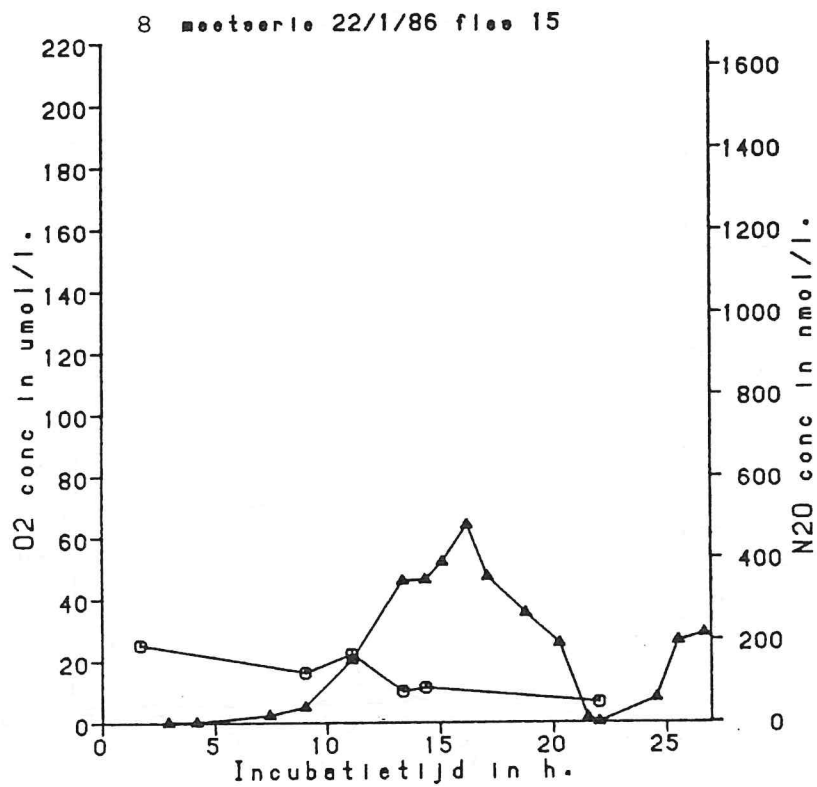
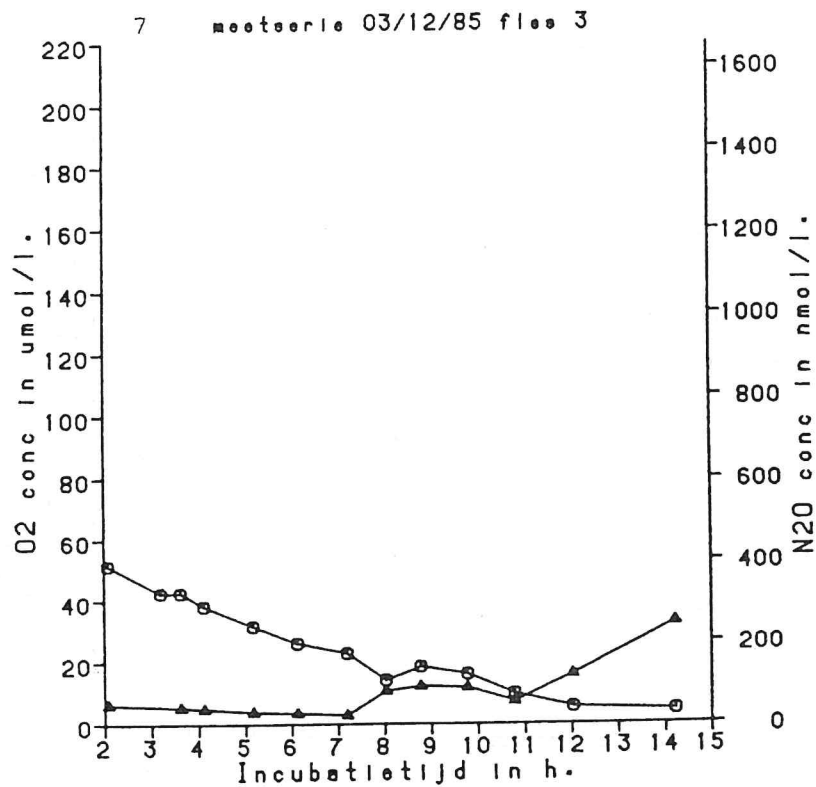
Meetserie 11 : 25/11/85

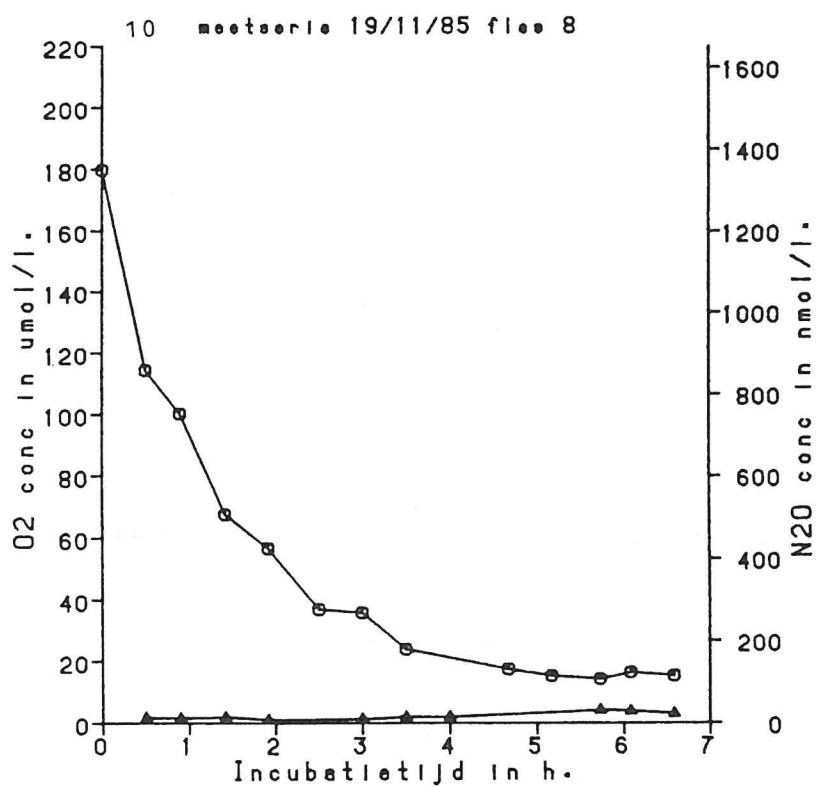
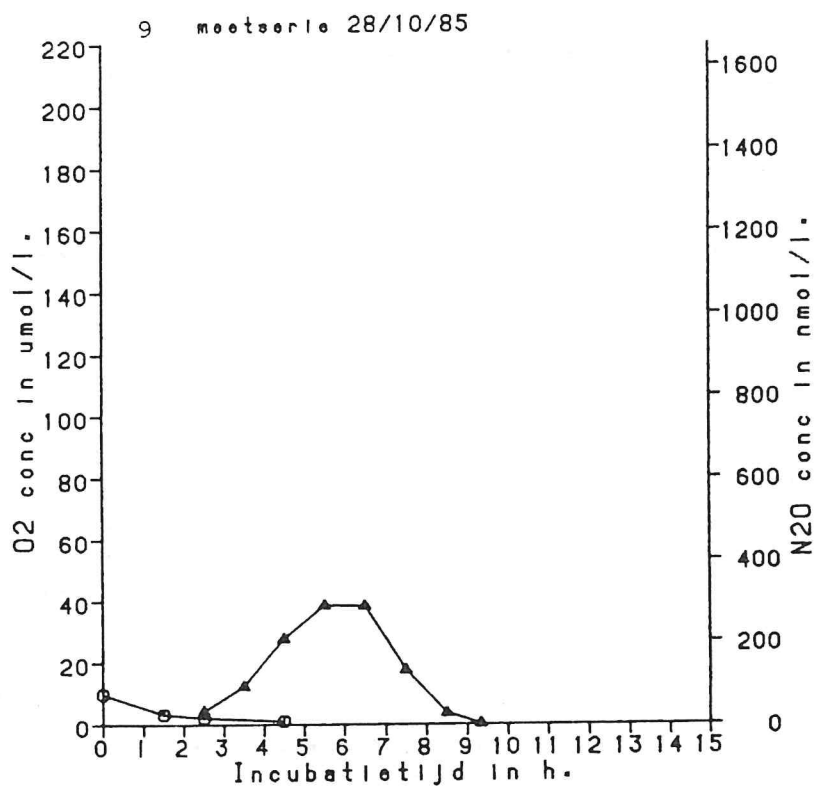
time hour	[O ₂] umol/l.	[N ₂ O] nmol/l.	dN ₂ O/dt nmol/cm ³ *h
1.50	87.13		
2.00	77.33		
2.50	63.17	10.583	-.004
2.92	55.54	10.754	.003
3.50	49.00	9.389	-.019
4.12	51.19	11.665	.030
4.75	42.48	11.608	-.001
5.17	39.21	11.437	-.003
5.67	45.74	11.152	-.005
6.25	41.39	6.657	-.062
6.83	40.30	8.307	.023
7.33	35.94	9.445	.018











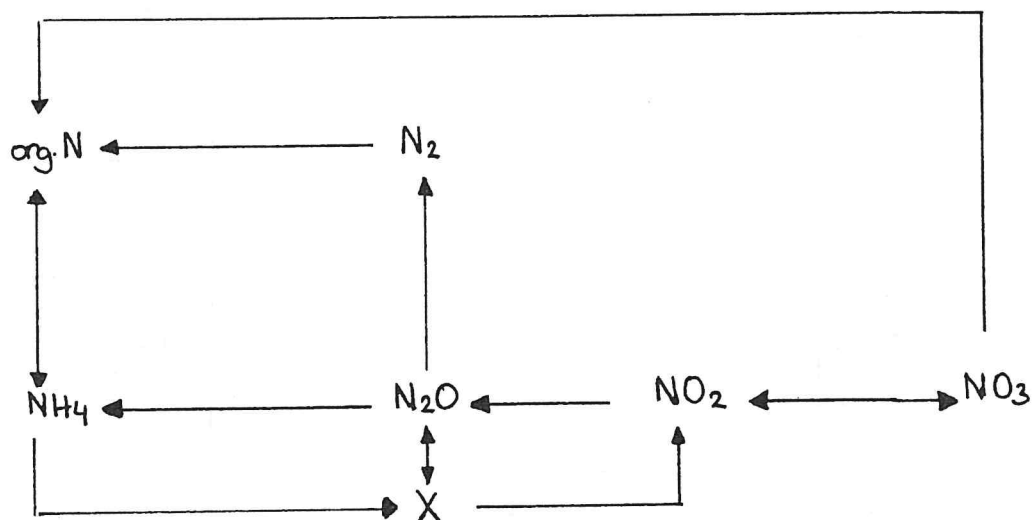
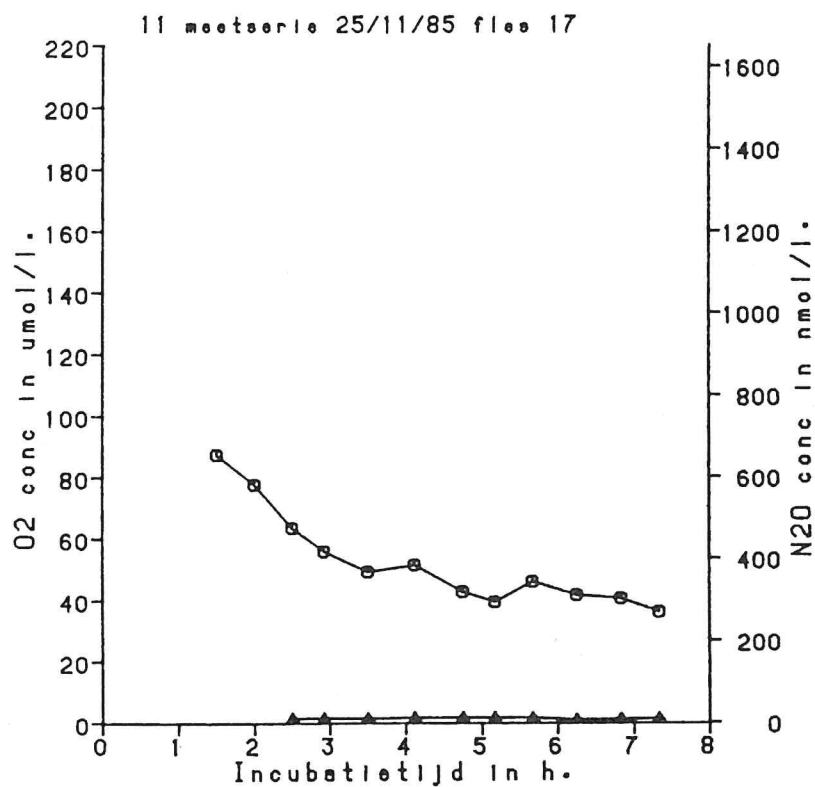


Fig. 1. De microbiële stikstof cyclus. De intermediair X is onbekend. (mogelijk N_2O , NH_2OH of HNO).

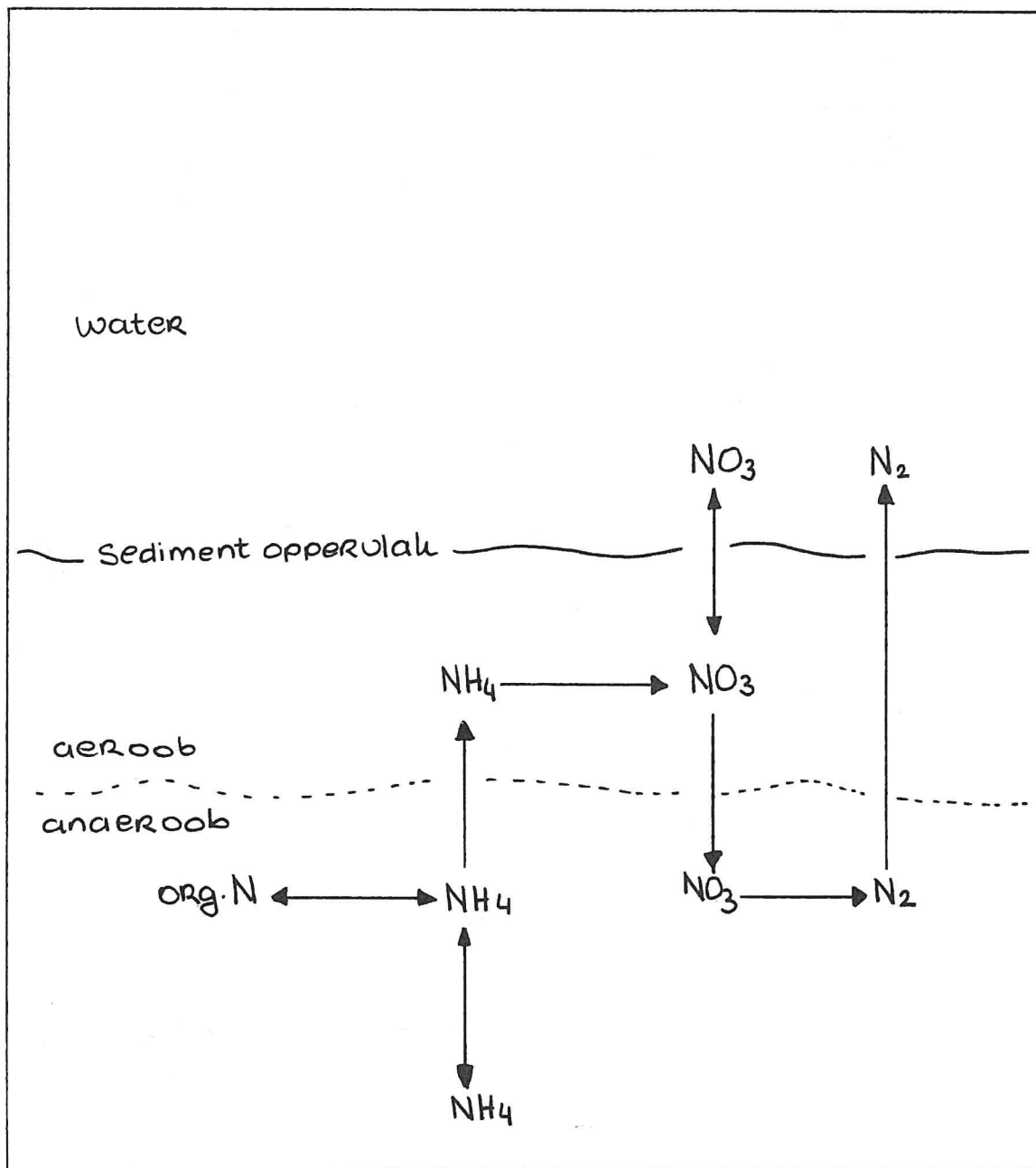


Fig. 2. Model voor de samenhang tussen nitrificatie en denitrificatie in sediment. (FENCHEL & BLACKBURN, 1978).

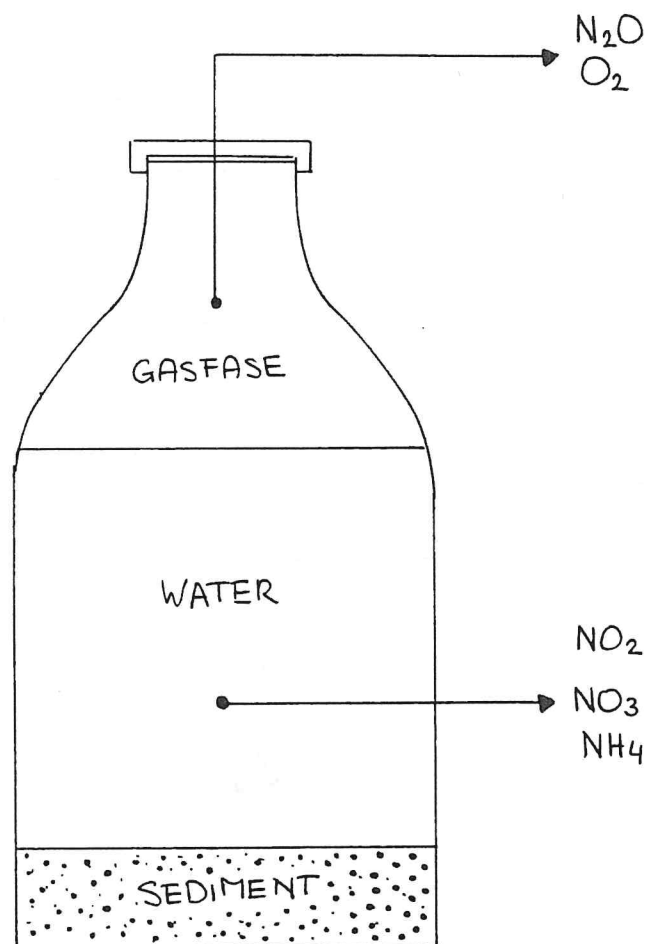
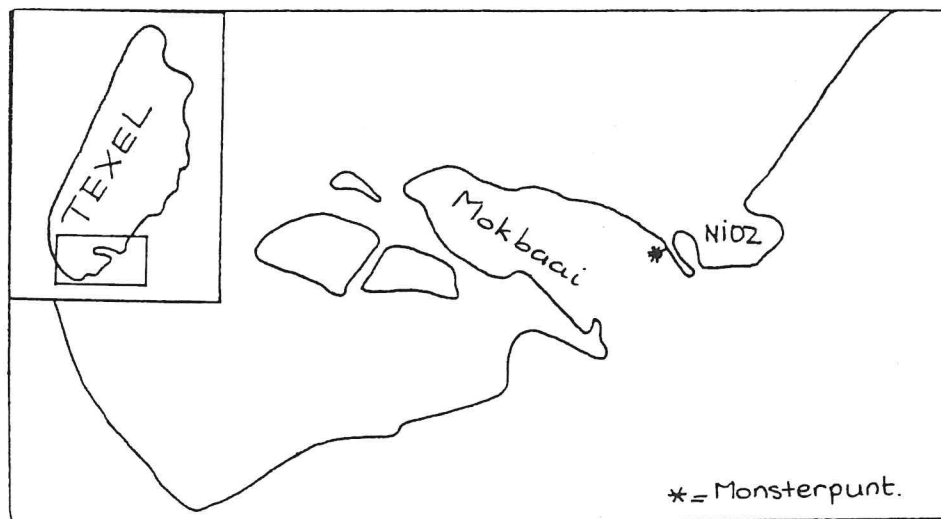


Fig. 3. De incubatiefles vóór het inzetten van de proef, de pijlen geven aan in welk compartiment gemonsterd wordt.

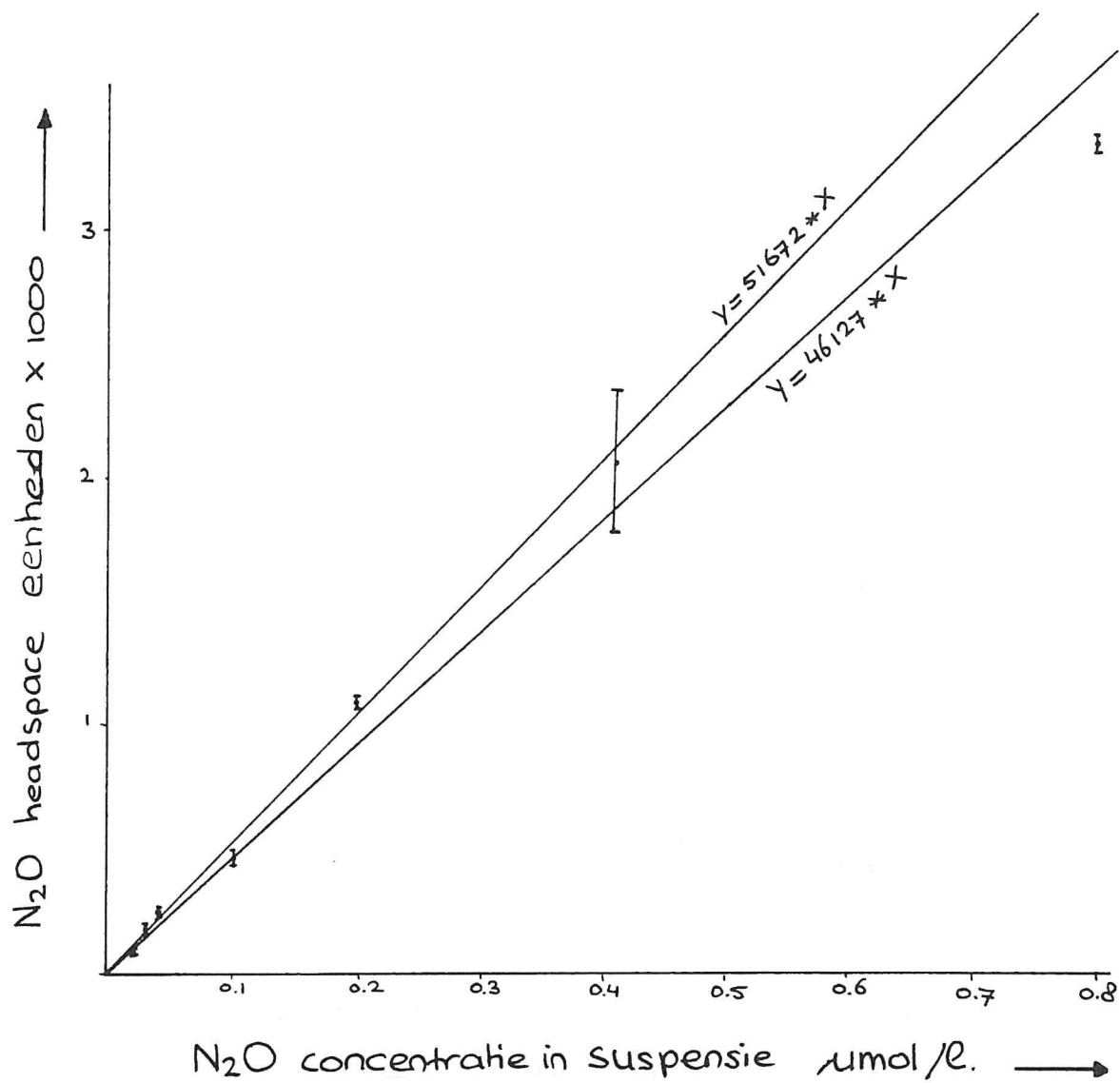


Fig. 4. De ijklijn voor concentratiebepaling van N₂O in de headspace.

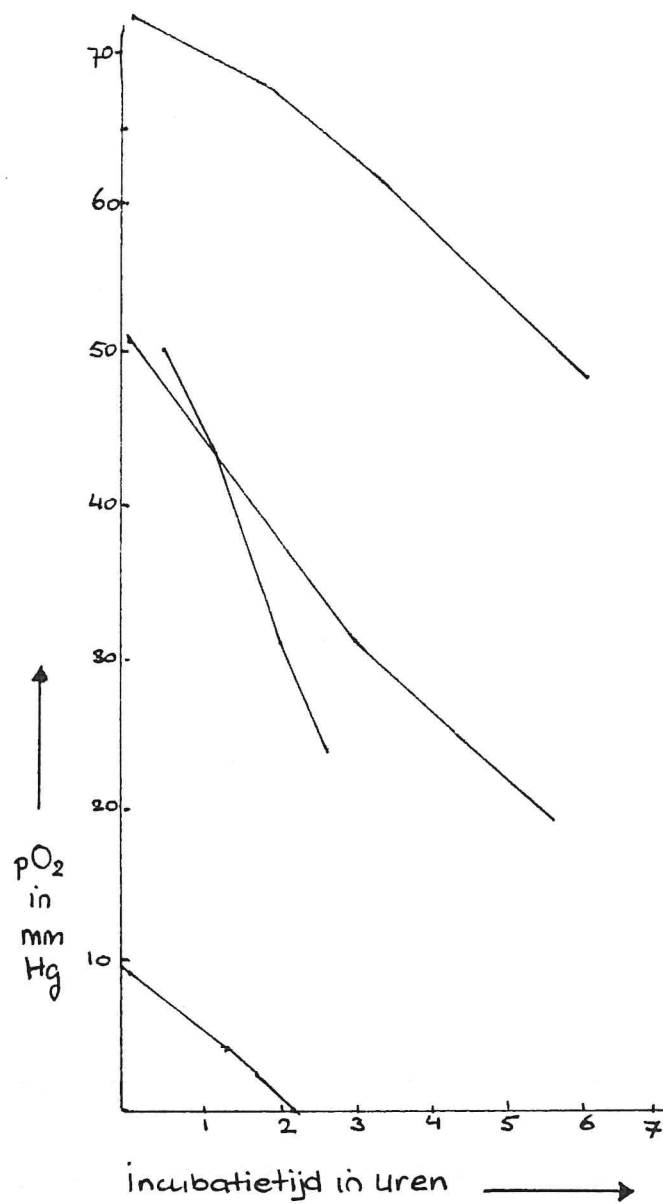


Fig. 5. De zuurstof afname bij een incubatie die gehomogeniseerd werd volgens methode 1.

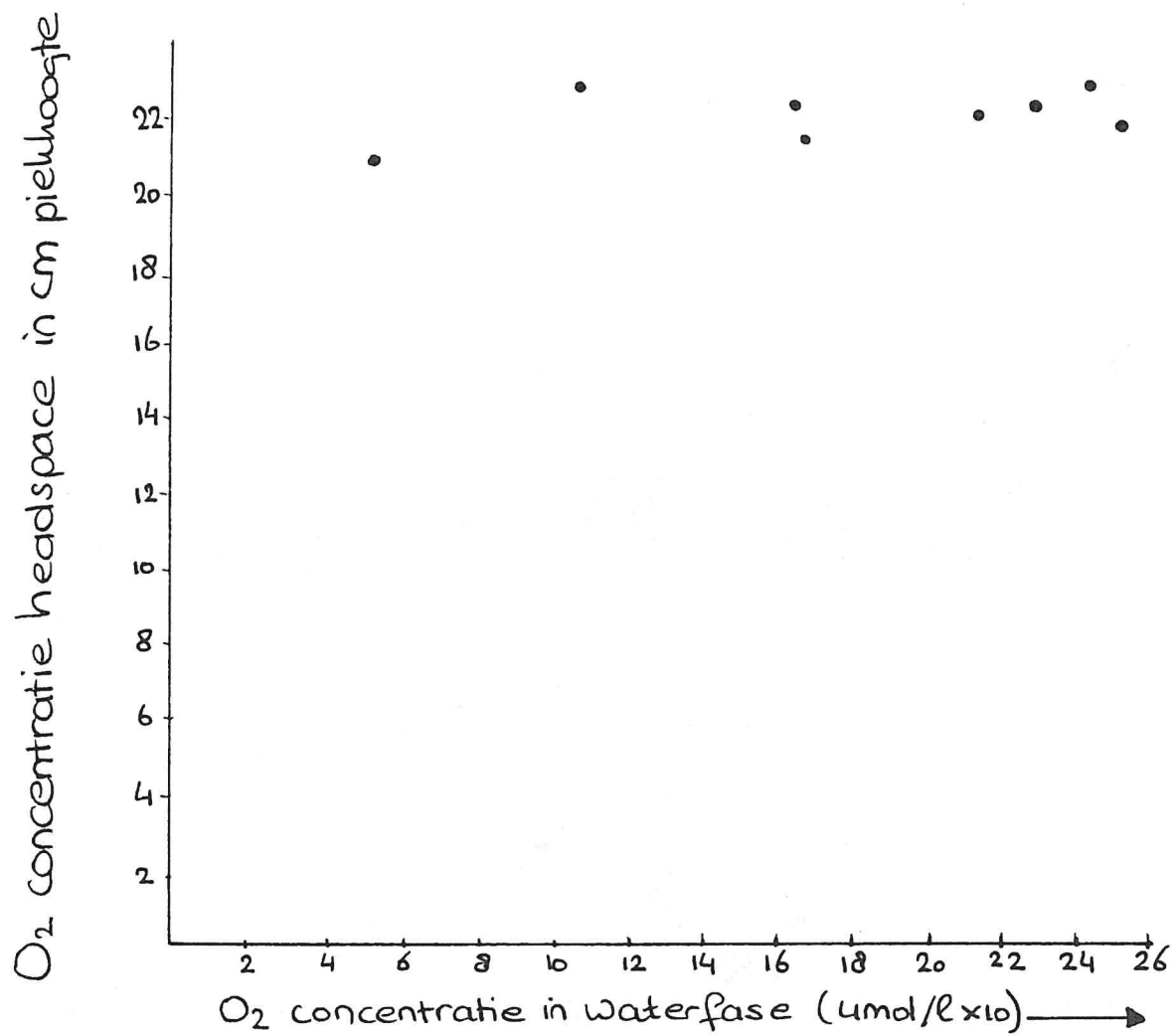


Fig. 6. De relatie tussen zuurstofconcentratie in de headspace en suspensie, zonder instelling van gasevenwicht.

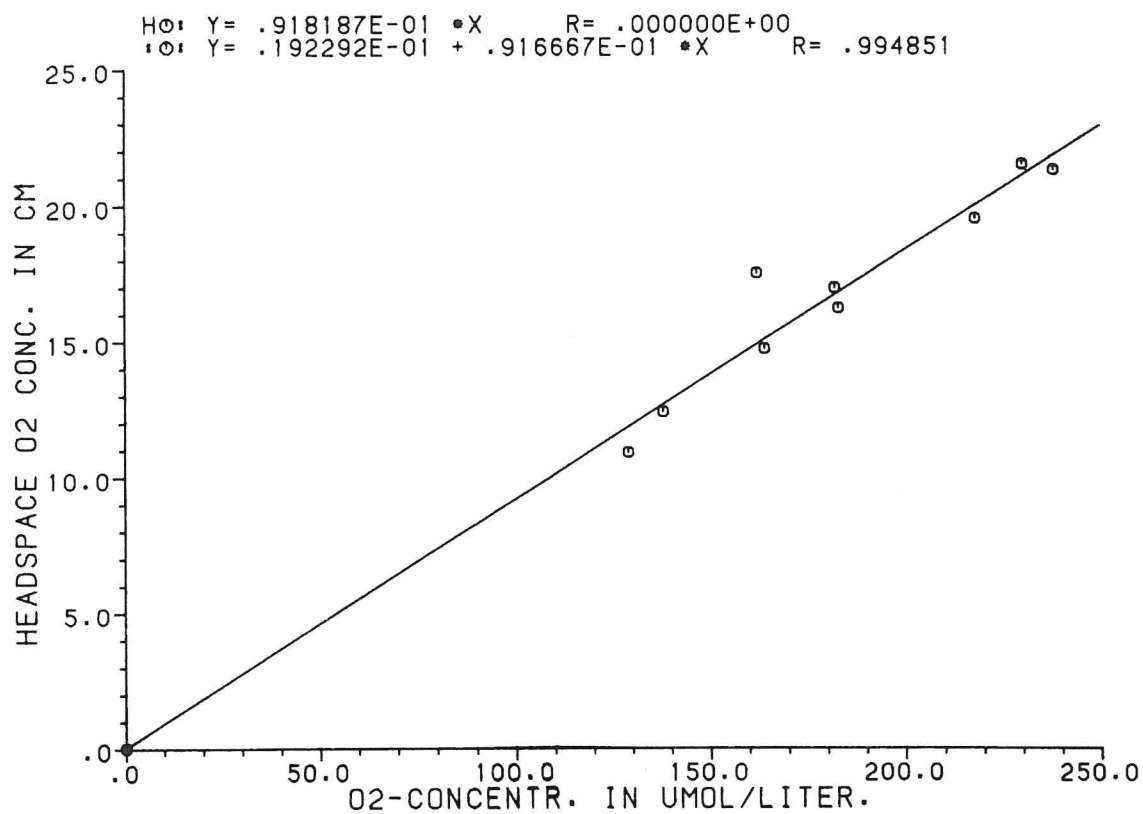


Fig. 7. De ijklijn voor de zuurstofconcentratie in de suspensie uit de relatieve waarden van de headspace concentratie.

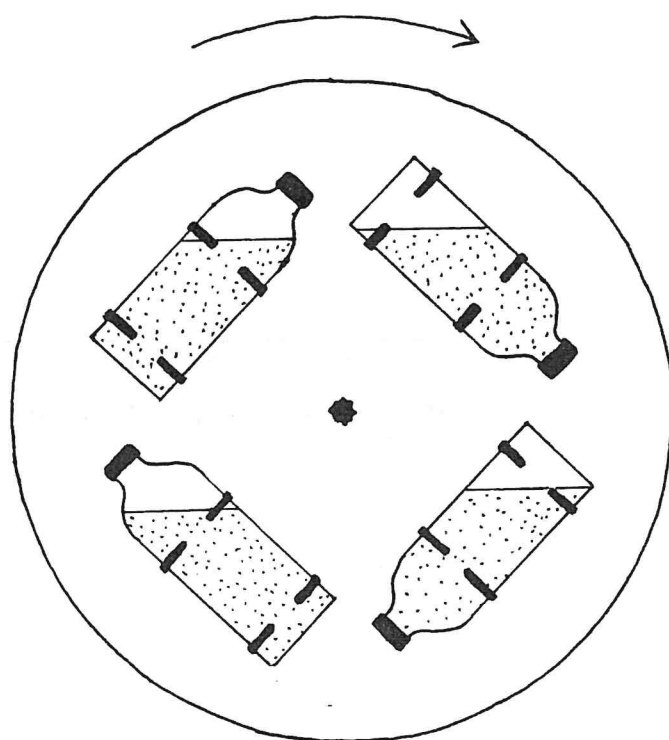


Fig. 8. Schema van het schudapparaat, gebruikt bij homogenisatie methode 5.

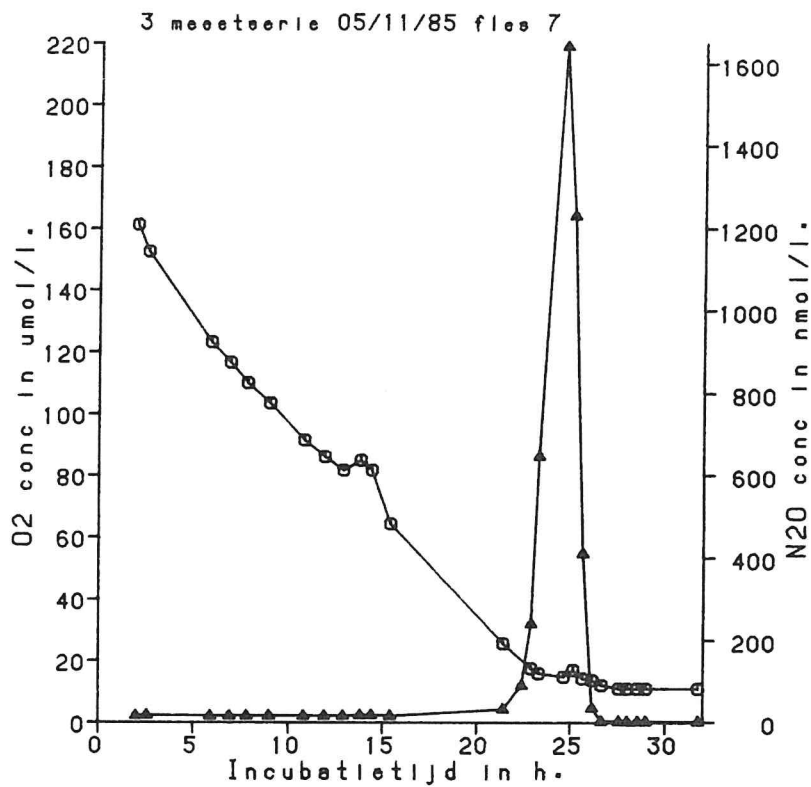


Fig. 9. Het verloop van zuurstof- en N₂O concentratie tijdens incubatie 1.

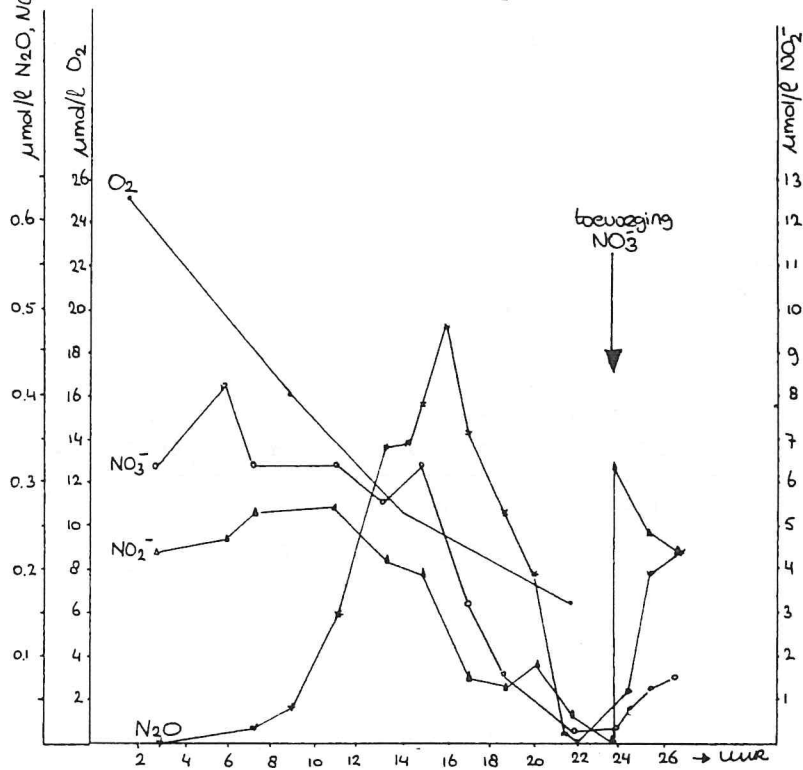


Fig. 10. Het verloop van zuurstof, N₂O, NO₃ en NO₂ in de tijd, met tussentijdse toevoeging van NO₃ (incubatie 8).

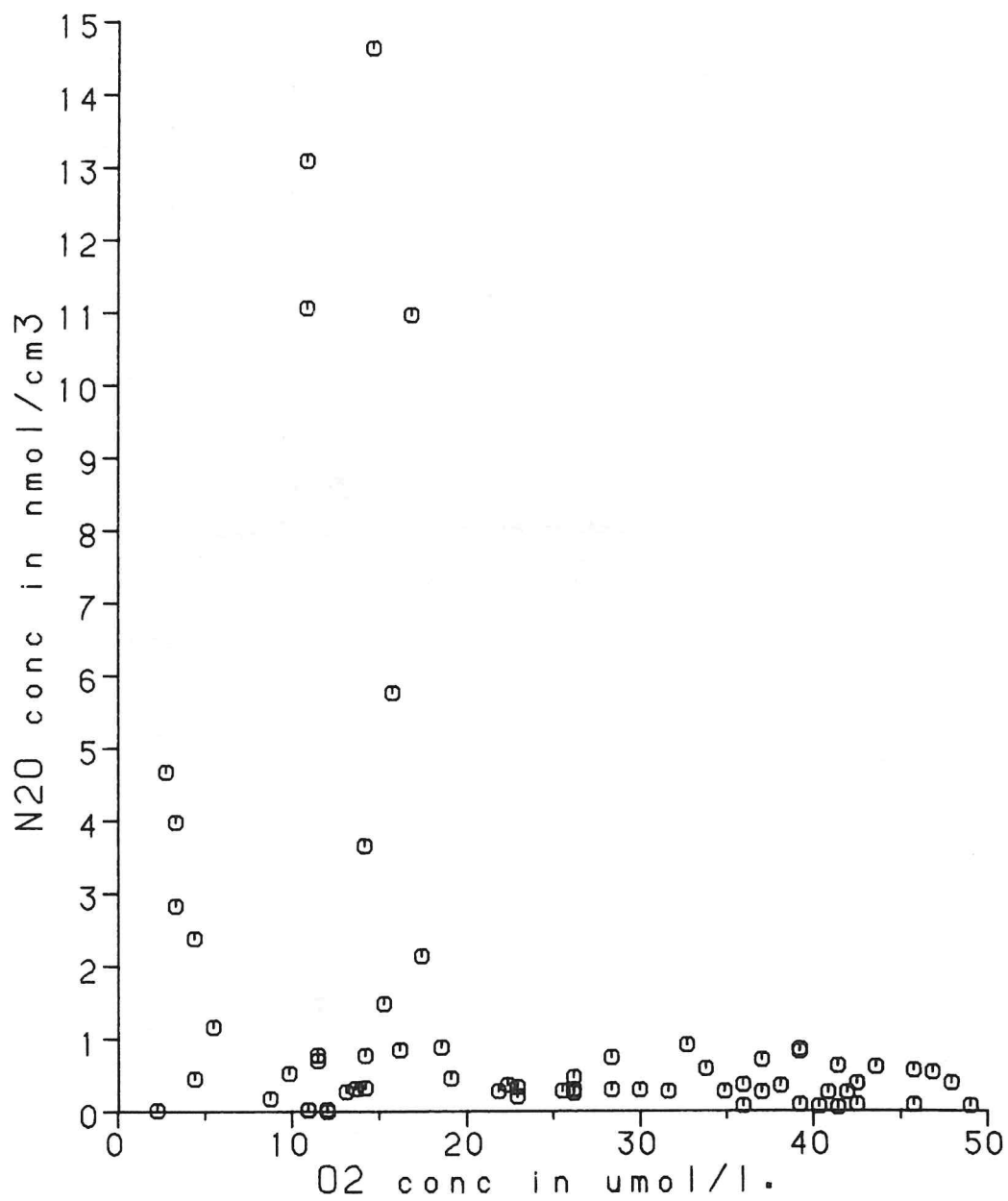


Fig. 11. De relatie tussen zuurstof- en N_2O concentratie voor de geselecteerde incubaties.

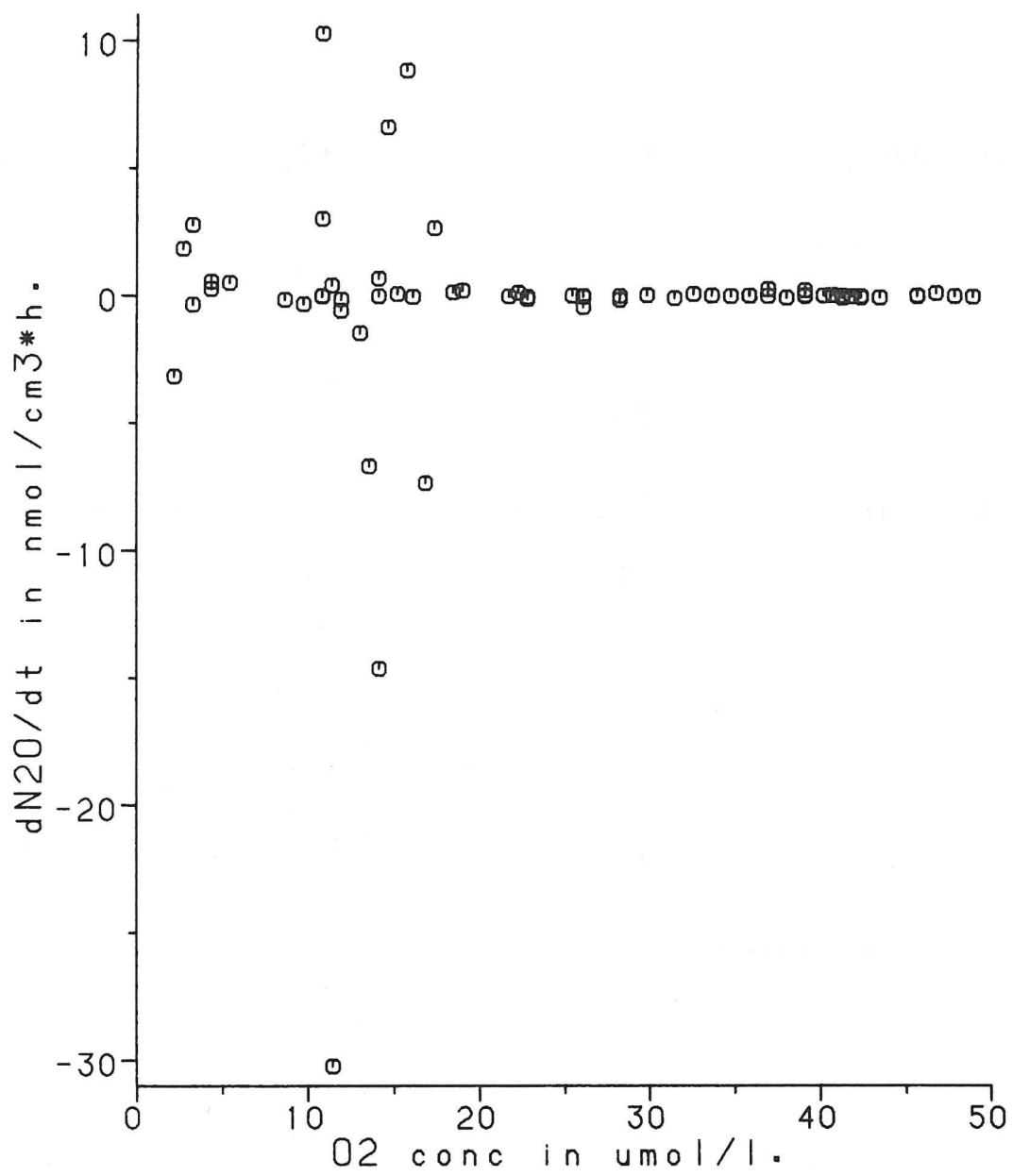


Fig. 12. De relatie tussen zuurstofconcentratie en N₂O productie voor de geselecteerde incubaties.

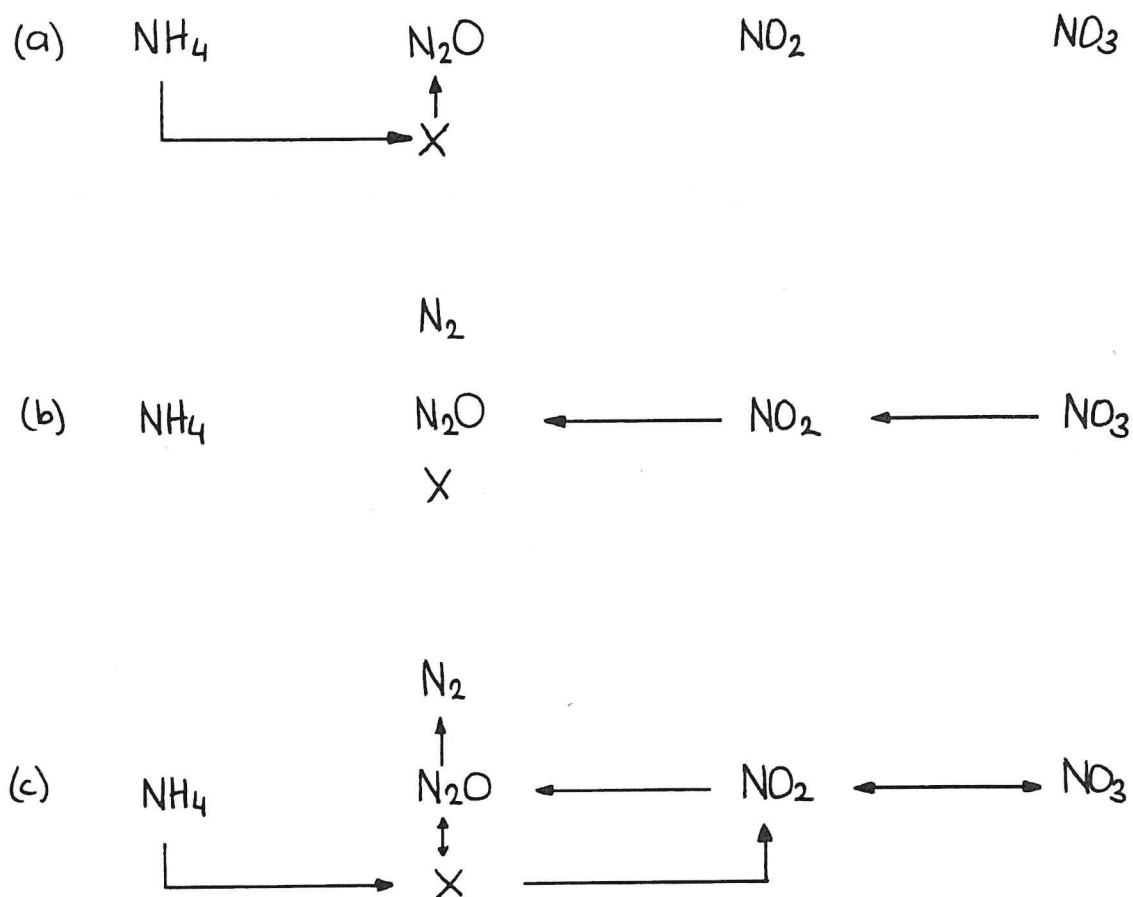


Fig. 13. Theoretische mogelijkheden voor N_2O accumulatie in wadsediment. a) N_2O accumuleert vanuit nitrificatie. b) N_2O accumuleert vanuit denitrificatie. c) N_2O accumuleert vanuit nitrificatie en denitrificatie.

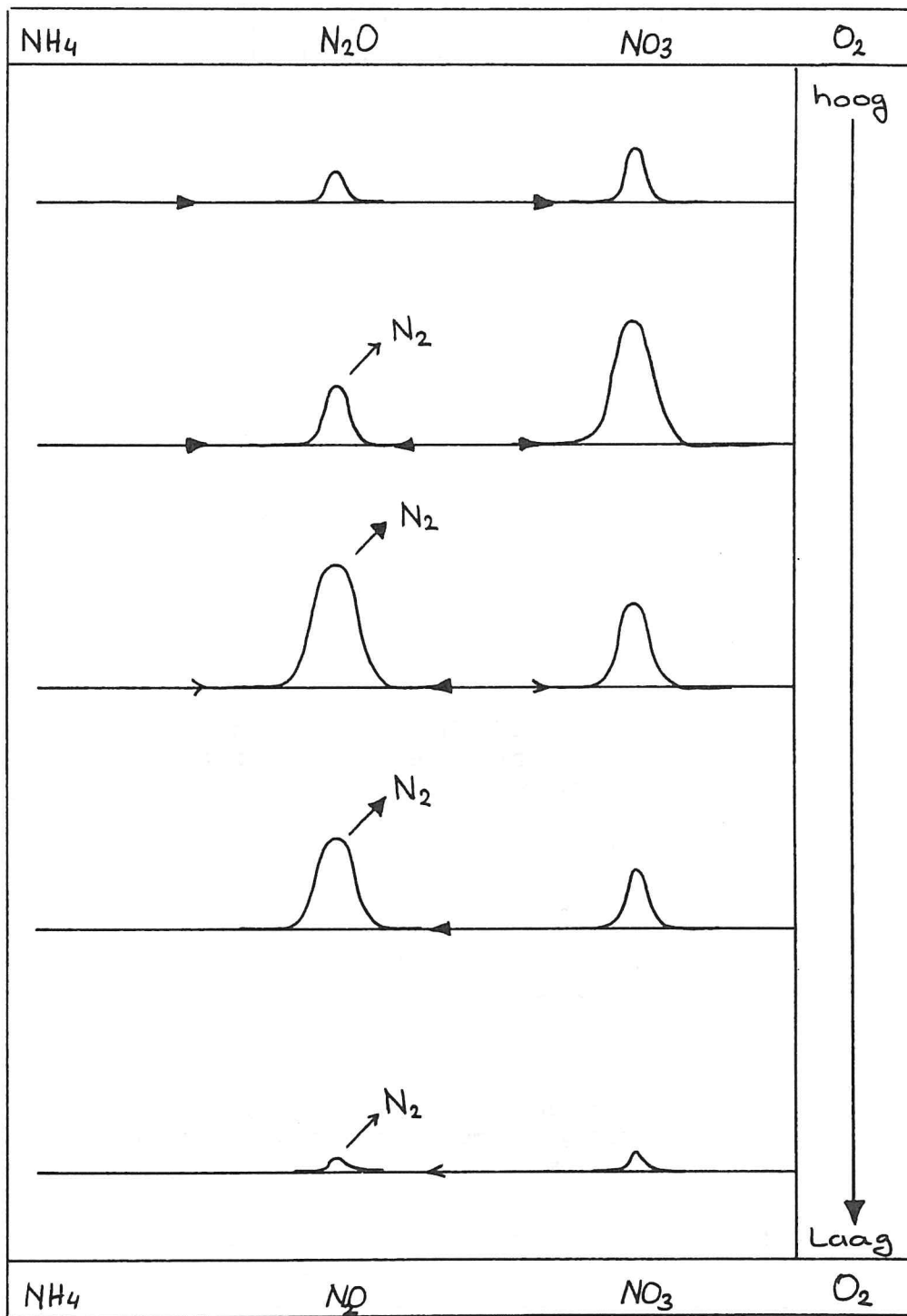


Fig. 14. De omschakeling van nitrificatie naar denitrificatie, bij afnemende zuurstofconcentratie.

Tabel I Gibb's vrije energie bij de verbranding van glucose met verschillende electron-acceptoren.

G' voor glucose KJ / mol.	acceptor
- 3190	O ₂
- 3090	Mn
- 3050	Mn
- 2920	Mn
- 2750	NO ₃
- 1410	Fe ₂ O ₃
- 1330	FeOOH
- 380	SO ₄
- 350	HCO ₃

Tabel II De bunsencoefficient voor zuurstof bij verschillende combinaties van temperatuur en saliniteit.

B (S,T)	Lit. Waarde
B (27,18)	0.0275
B (27,20)	0.0265
B (30,18)	0.0269
B (30,20)	0.0260

Tabel III Sedimentdichtheid bepaald voor nat en droog sediment bij verschillende Mok-baai monsters.

Nr	volume cm ³	nat gewicht gram	dichth. gr/cm ³	% water
1	258.6	527.5	2.01	17.3
2	197.0	401.9	2.04	18.5
3	133.0	259.0	1.95	18.3

Tabel IV Overzicht van de karakteristieke gegevens
over het verloop van alle incubaties.

NR	sediment	headspace	datum	vol.head. ml	vol. susp. ml	vol.sed. cm3
1	Mokbaai	lucht	05/11/85	142	500	52.5
2	Mokbaai	lucht	05/11/85	142	500	59.3
3	Mokbaai	lucht	11/11/85	142	500	80.8
4	Mokbaai	lucht	26/11/85	142	500	80.6
5	Mokbaai	lucht	26/11/85	142	500	61.1
6	Mokbaai	lucht/N2	03/12/85	50	592	75.4
7	Mokbaai	lucht/N2	03/12/85	100	542	74.7
8	Mokbaai	lucht/N2	22/01/86	242	400	81.0
9	Mokbaai	N2	28/10/85	242	400	52.2
10	Wadbak	lucht	19/11/85	142	500	40.5
11	Wadbak	lucht	25/11/85	142	500	93.1

Nr	[N2O]max nmol/l.	acc.max nmol/cm3*h	afn.max nmol/cm3*h	start umol02/l	piek umol/02/l	T piek h	T aanl. h
1	1643	8.9	14.6	25.5	14.7	25	10
2	1036	10.3	30.2	26.1	10.9	30	10
3	160	0.2	0.2	41.4	15.3	55	30
4	32	0	0				
5	32	0	0				
6	518	2.8	3.2	8.7	2.7	10	4
7	>248	0.7	0.3	22.9	4.4	>14	>7
8	480	0.9	1.5	25.0	11.2	15	10
9	288	1.8	2.4	2	1.0	6	6
10	31	0.2	0.2				
11	12	0	0				

Tabel V Overzicht van de verschillende productie
en consumptie snelheden zoals die te
vinden zijn in de literatuur.

plaats	snelheid nmol N /cm ³ *h	referentie
Denitrificatie in sediment		
Limfjord Denemarken	36	Sørensen (1978 a)
Randers fjord Denemarken	1.5	Sørensen (1978 b)
Kysing Fjord	0.5	Oren & Blackburn (1979)
Tokyo Bay	1.7-2.0	Nishio (1982)
Japan		
Tama Estuary	56	Nishio & al. (1982)
Japan		
Nitrificatie in sediment		
Alaska	0.27	Iizumi & al.
Massachusetts USA	2	Kaplan & al. (1979)
Japan	5	Koike & Hattori (1978)
Noordzee	2.8	Vanderborght & Billen (1975)
	21	Billen (1978)
	2	Billen (1976)
Deense kust	2.5	Hendricksen (1980)
Nieuw Zeeland	2.2	Belser & Mays (1980)

(Overgenomen uit "Nitrogen in the marine enviroment."
Carpenter & Capone
blz 175, 210 en 211.)