



Seges
Att.: Frank Oudshoorn

Agro Food Park 15, Skejby
8200
Aarhus N,
FRWO@seges.dk

Teknologisk Institut
Agro Food Park 15, Skejby
8200 Aarhus N
Telefon +45 72 20 20 00

info@teknologisk.dk
<http://www.teknologisk.dk>

Laboratorienotat

Screening af naturlige og biologiske nitrifikationshæmmere

Opgaven:

- At udvikle en forsøgsopstilling til screening af effekten af nitrifikationshæmmere
- At udføre laboratorieforsøg som kan belyse effekten af naturlige eller biologiske additiver der kan hæmme N₂O udledning og kan bruges i økologi

Analyse periode:

Fire forsøg at 14 dages varighed i perioden 11.01.2020 – 08.03.2020

Forsøgsadresse

Teknologisk Institut, Agro Food Park 15, 8200 Aarhus N.

Bemærkninger:

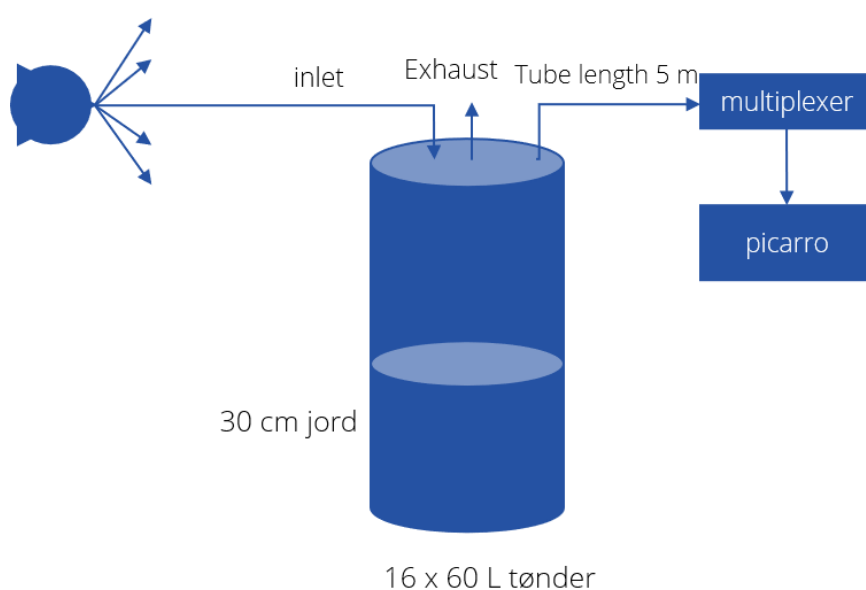
Der er på ingen måde tale om en standardiseret test eller verifikation af de testede produkter men blot et forhåndsindtryk af produkterne i denne applikation.

Baggrund:

Der blev i perioden 11.01.2020 – 08.03.2020 udført et screeningsforsøg, hvor naturlige og biologiske nitrifikationshæmmers effekt på udledning af lattergas (N₂O) fra økologisk gødet jord blev undersøgt. Forsøgene blev udført på Koldkærgård, Agro Food Park 10, Aarhus N. Screeningsforsøgene indgik som en del af projektet, "Mindre lattergasudledning med naturlige nitrifikationshæmmere".

Metode

I Figur 1 ses forsøgsopstilling bestående af 16 x 60 L cylindriske ventilationskamre. Tre m³ lerjord blev opsamlet fra en brakmark ved Agro Food Park 10, Aarhus N, ved at skovle de øverste 30 cm jord af. Bulk jorden blev opbevaret indenfor i big bags ved rum temperatur på mellem 10-14 °C under hele forsøgsperioden. Der blev ved forsøgsstart taget prøver af bulk jorden til senere karakterisering. Herefter blev der først fyldt 20 cm jord i hver af 16 ventilerede kamre, svarende til mellem 20 og 25 kg pr kammer. Jorden blev hakket med spade for at få ensartet jordklumpstørrelse kamrene imellem. Efterfølgende blev der afvejet 10 kg jord fra bulk jorden, som blev blandet med 8.7 g Øgro 10-3-1 Basisgødning med højt kvælstofindhold opløst i 300 g vand. Gødningsmængden var svarerende til 100 kg N/ha. Nitrifikationshæmmere blev også tilsat og sammenblandet med de 10 kg jord. Efter tilsætning af inhibitor og gødning til de 10 kg Jord, blev jorden forsigtigt hældt oveni kamrene, som i forvejen indeholdt 20 cm jord. Den samlede mængde jord i hvert kammer udgjorde dermed ca. 30 cm svarende til 30-35 kg. Inhibitor type og dosis ses i tabel 1 - tabel 4. Der blev sat låg på alle kamre og en pumpe doserede kontinuert 2 L luft/min til headspace af hvert kammer. N₂O,



Figur 1. Forsøgsopstilling til test af nitrifikationshæmmers effekt på flux af ammoniak, lattergas, metan og kuldioxid fra gødet jord.

NH₃, CO₂, CH₄ og H₂O blev kontinuert monitoreret på udgangsstrømmen fra kammeret med en Picarro 2508 analyser. En multiplexer ventiler skiftede mellem de 16 kamre med en måleperiode på 10 min pr. kammer. Kamrene var placeret bag et forhæng, hvor temperaturen blev styret til mellem 20-25 °C med radiatorer og luftcirkulation. I alt blev fire sådanne forsøg udført, hver med en varighed af 14 dage. Ved slutning af hvert forsøg blev der opsamlet jordprøver af de øverste 10 cm fra alle 16 kamre til senere karakterisering.

I alt blev 8 forskellige nitrifikationshæmmere undersøgt i screeningsforsøgene. Disse var økologisk plant acid fra AddCon, Sheaskrå fra OK Biotech, Actiferm fra VISKAL, gavnlige mikroorganismer fra GreenF, pilebarksaft fra Grainas A/S, ZeoSand fra ZeoCem, BioChar af blandet strå fra Frichs Pyrolyse, 50% Tannic acid ekstraheret fra gallenøder i Kina, tørret og knust Lancet Vejbred opsamlet i Foulum. I forhold til Sheaskrå, Pilebarksaft, Lancetvejbred og plant acid blev valgt med antagelsen om at der var et betydeligt indhold af tanniner. Tanniner er sekundære metabolitter udskilt af planter som forsvarsmekanisme mod mikroorganismer og talrige studier har vist en antimikrobiel effekt af tanniner [1–3]. Tanniner dækker dog over en lang række stoffer som har en fælles kernestruktur bestående af polyphenoler og dermed også forskellig virkningsgrad mod mikroorganismer. Zeolit (ZeoSand) og Biochar blev valgt da de kan absorbere næringstoffer og



ioner, hvilket kan reducere tabet af N i form af N₂O til atmosfæren [4–6]. Actiferm og GreenF er aktive mikroorganismer også kaldet biostimulanter, som potentielt kan virke jordforbedrende og øge optaget af bl.a. nitrogenholdige substrater [7]. Alle inhibitorer blev undersøgt i to koncentrationer og testet i triplikater. GreenF blev i forsøg 2 undersøgt i en koncentreret opløsning. Her blev det for kammer 1, 3 og 5 delvist blandet i de 10 kg jord og delvist overridslet de 10 kg jord efter jorden var kommet i kammeret. Den koncentrerede GreenF opløsning blev efterfølgende vurderet til at være for dyr ved opskalering. Derfor blev en tyndere GreenF opløsning også testet i forsøg 4 svarende til en pris på 250 kr./ha. Prisen på den koncentrerede GreenF i kendes ikke.

Tabel 1. Forsøg 1. 11.01.2021-25.01.2021

Forsøg 1: 11. Jan	Jord + gødning	inhibitor	Inhibitor dosis tilsat 10 kg jord (g)
T1	Ja	Sheaskrå	23
T2	Ja	Sheaskrå	90
T3	Ja	Sheaskrå	23
T4	Ja	Sheaskrå	90
T5	Ja	Sheaskrå	23
T6	Ja	Sheaskrå	90
T7	Ja	ZeoSand	43
T8	Ja	ZeoSand	215
T9	Ja	ZeoSand	43
T10	Ja	ZeoSand	215
T11	Ja	ZeoSand	43
T12	Ja	ZeoSand	215
T13	Ja	Nej	0
T14	Ja	Nej	0
T15	Ja	Nej	0
T16	Nej	Nej	0

Tabel 2. Forsøg 2. 25.01.2021-08.02.2021

Forsøg 2: 25. Jan	Jord + gødning	inhibitor	Inhibitor dosis tilsat 10 kg jord (g)
T1	Ja	GreenF koncentreret	100 blandet i jord + 100g overridslet jord + 200 g vand
T2	Ja	GreenF koncentreret	200 overidslet + 200 g vand
T3	Ja	GreenF koncentreret	100 blandet i jord + 100g overridslet jord + 200 g vand
T4	Ja	GreenF koncentreret	200 overidslet + 200 g vand
T5	Ja	GreenF koncentreret	100 blandet i jord + 100g overridslet jord + 200 g vand
T6	Ja	GreenF koncentreret	200 overidslet + 200 g vand
T7	Ja	Biochar	129
T8	Ja	Biochar	430
T9	Ja	Biochar	129
T10	Ja	Biochar	430
T11	Ja	Biochar	129
T12	Ja	Biochar	430
T13	Ja	Nej	0
T14	Ja	Nej	0
T15	Ja	Nej	0
T16	Nej	Nej	0



Tabel 3. Forsøg 3. 08.02.2021-22.02.2021

Forsøg 3: 08. Feb	Jord + gødning	inhibitor	Inhibitor dosis tilsat 10 kg jord (g)
T1	Ja	Actiferm	10
T2	Ja	Actiferm	200
T3	Ja	Actiferm	10
T4	Ja	Actiferm	200
T5	Ja	Actiferm	10
T6	Ja	Actiferm	200
T7	Ja	Plant acid	23
T8	Ja	Plant acid	90
T9	Ja	Plant acid	23
T10	Ja	Plant acid	90
T11	Ja	Plant acid	23
T12	Ja	Plant acid	90
T13	Ja	Nej	0
T14	Ja	Nej	0
T15	Ja	Nej	0
T16	Nej	Nej	0

Tabel 4. Forsøg 4. 22.02.2021-08.03.2021

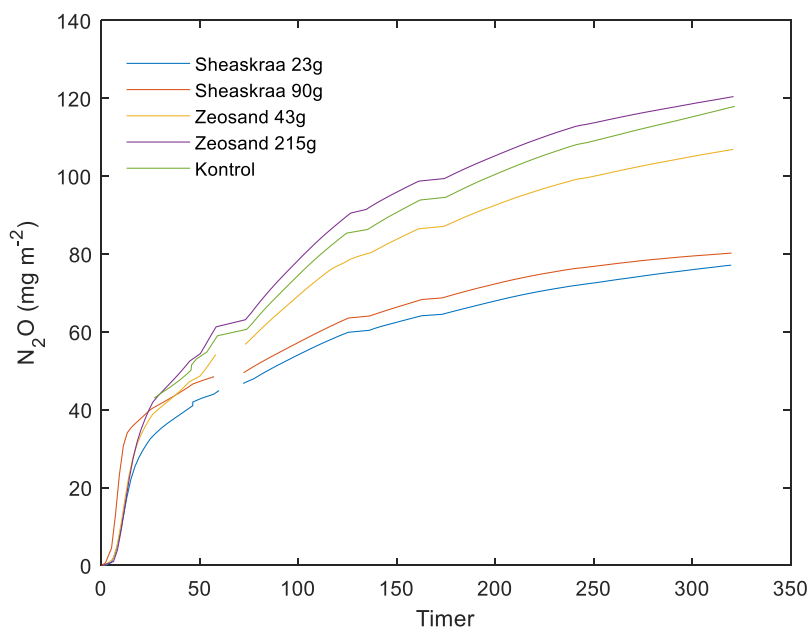
Forsøg 4: 22. Feb	Jord + gødning	inhibitor	Inhibitor dosis tilsat 10 kg jord (g)
T1	Ja	Pilebarksaft	90
T2	Ja	Lancet vejbred	80
T3	Ja	Pilebarksaft	90
T4	Ja	Lancet vejbred	80
T5	Ja	Pilebarksaft	90
T6	Ja	Lancet vejbred	80
T7	Ja	Tannic acid	90
T8	Ja	GreenF fortyndet	200 + 200 g vand
T9	Ja	Tannic acid	90
T10	Ja	GreenF fortyndet	200 + 200 g vand
T11	Ja	Tannic acid	90
T12	Ja	GreenF fortyndet	200 + 200 g vand
T13	Ja	Nej	0
T14	Ja	Nej	0
T15	Ja	Nej	0
T16	Nej	Nej	0

Resultater

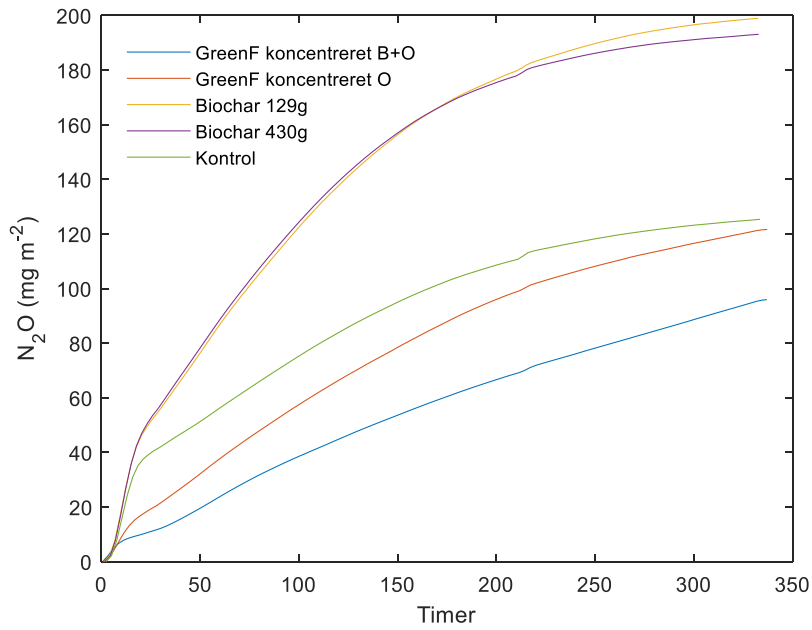
Figur 2-5 viser den gennemsnitlige kumulerede N₂O udledning over 14 dage fra de fire forsøg. Figur 6-9 viser mineraliseret nitrogen ved forsøgenes afslutning i form af nitrat og ammonium-N. I Tabel 5 vises reduktionen af gasudledninger, hvor røde tal markerer en signifikant forskel fra kontrollen ved One-way ANOVA test efterfulgt af Tukey Kramer metoden [8]. Negative reduktioner svarer til øget udledning. Den kumulerede udledningen af N₂O faldt generelt for kontrollerne over de fire forsøg, hvilket kan skyldes en lavere fugtighed i den jord der blev brugt. Generelt blev der udledt mest N₂O indenfor de første 3-4 dage, hvorefter udledningsraten faldt. Plant acid 23g og Plant acid 90g reducerede N₂O udledninger signifikant med hhv. 42±13% og 52±7,6%. Reduktionen er i overensstemmelse med Figur 8, hvor der ses lave koncentrationer af nitrat for plant acid behandlingerne i forhold til kontrollen. Sheaskrå havde også en reducerende effekt, som dog ikke var statistisk signifikant. I Figur 6 bekræftes denne effekt da nitrat indholdet igen er lavt i forhold til kontrollen. For både sheaskrå og plant acid tyder det på at det er nitrifikation som hæmmes. Sheaskrå indeholder tanniner og saponiner, hvilket kan have hæmmet den mikrobielle omsætning af organisk og uorganisk N til N₂O. Plant acid fremskaffes ved ekstrahering på asiatiske frugter, men mere nøjagtigt kendes sammensætningen ikke, hvorfor nærmere karakterisering af dette additiv bør laves. Tannic acid (50%) viste en markant N₂O udledning i starten, hvorefter udledningsraten var meget lille (Figur 5). Samtidigt ses et meget lavt nitrat indhold for Tannic acid (50%) behandling i Figur 9. Dette kan indikere at nitrifikation var hæmmet, men at andre N-holdige stoffer i Tannic acid



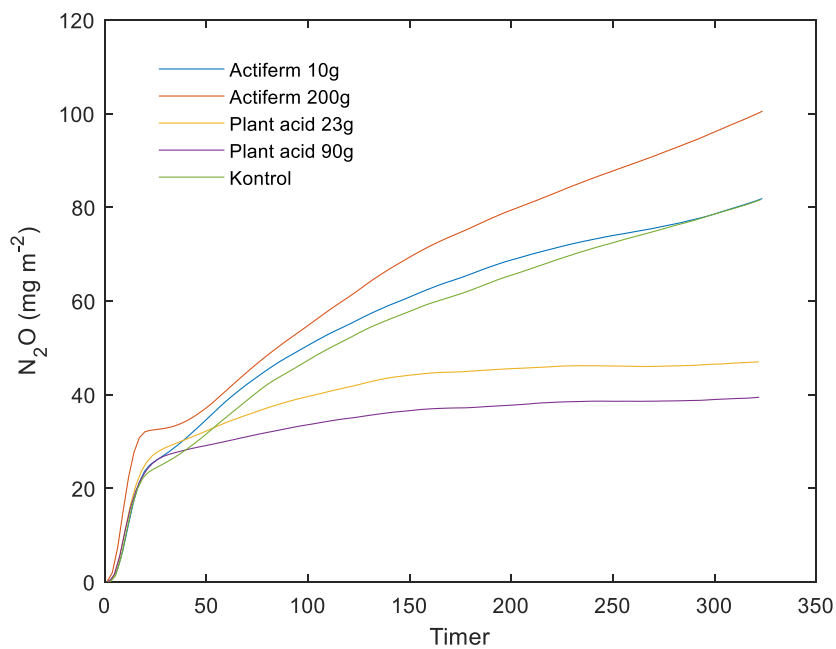
pulveret har bidraget til stor N₂O udledning i starten. Lancetvejbred, pilebarksaft, biochar 430 g og fortyndet GreenF øgede udledningen af N₂O signifikant. Lignende resultater er før set for flash pyrolyseret biochar [4]. Derfor bør biochar til dette formål ikke produceres med flash metoden. Metan udledninger var meget små under de relativt aerobe forhold og der var ingen signifikant forskel mellem behandlingerne og kontrollerne med undtagelse af biochar, som udledte betydelige mængder CH₄ i starten af forsøget. Ammoniak udledninger peakede indenfor de første 24 timer, hvilket kan skyldes fordampning af den lille mængde NH₄-N i gødningsproduktet. Flere af nitrifikationshæmmerne, heriblandt biostimulanterne GreenF og Actiferm, hævdes at øge tilgængeligheden af optageligt N for planterne og det er sandsynligt at effekten af disse produkter ville være anderledes ved beplantning i jorden. Nogle af produkterne havde også et højere vandindhold, hvilket i sig selv kan føre til øget N₂O produktion. Totalt kulstofindhold af råjorden blev målt ved starten af forsøg1 til 1.52±0.06%, hvorimod tørstof indholdet blev målt løbende som vist i Figur 10. Det ses i Figur 10 at råjordens tørstofindhold var stigende fra forsøg1 (80,9%) til forsøg4 (88,3%), hvilket skyldes at jorden blev opbevaret indenfor og afgav fugt. Særligt ved tilsætning af GreenF var det et krav ifølge tilsætningsanvisninger fra producenten, at der blev tilført ekstra vand. Derfor ses også en forskel på tørstofindholdet ved slutningen af forsøg2 mellem GreenF behandlet jord og kontrollen. Effekten af fugt kan være en betydelig fejlkilde i forsøget, men det er ikke muligt at drage en endelig konklusion af påvirkningen på baggrund af den indsamlede data.



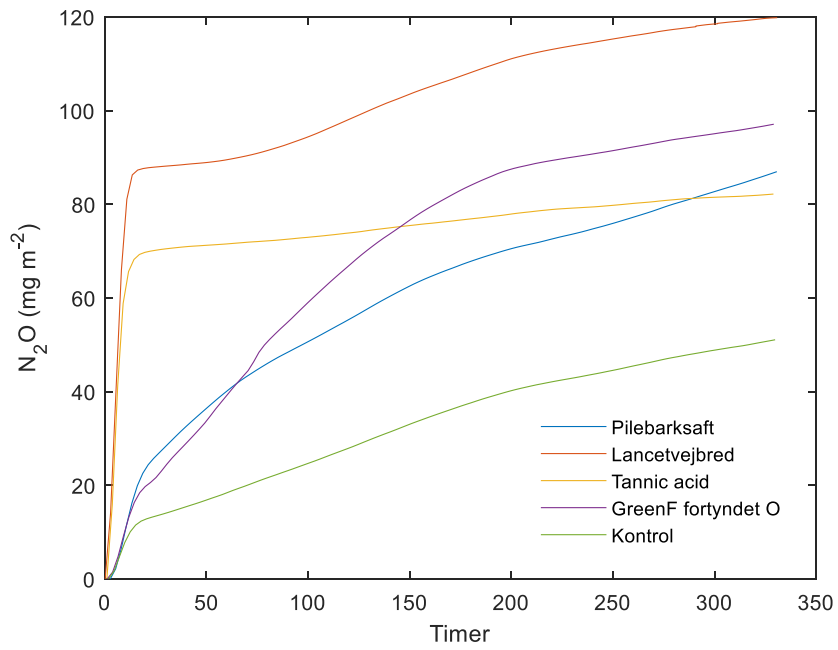
Figur 2. Kumulativ N₂O udledning fra forsøg 1 i perioden 11.01.2021 - 25.01.2021. Ved 60-70 timer var der flere strømafbrydelser og data mangler derfor.



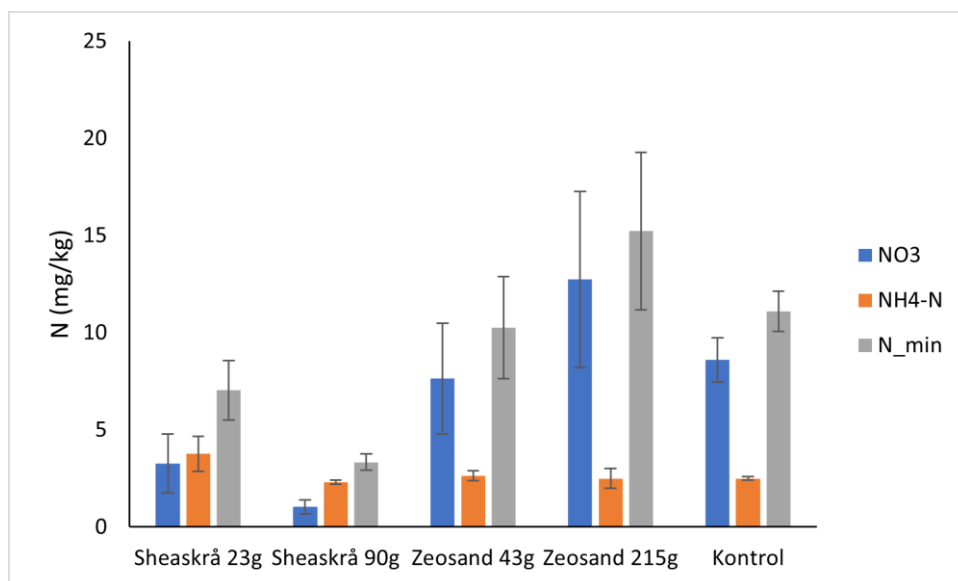
Figur 3. Kumulativ N₂O udledning fra forsøg 2. B+O er blandet + overridslet, O er overridslet.



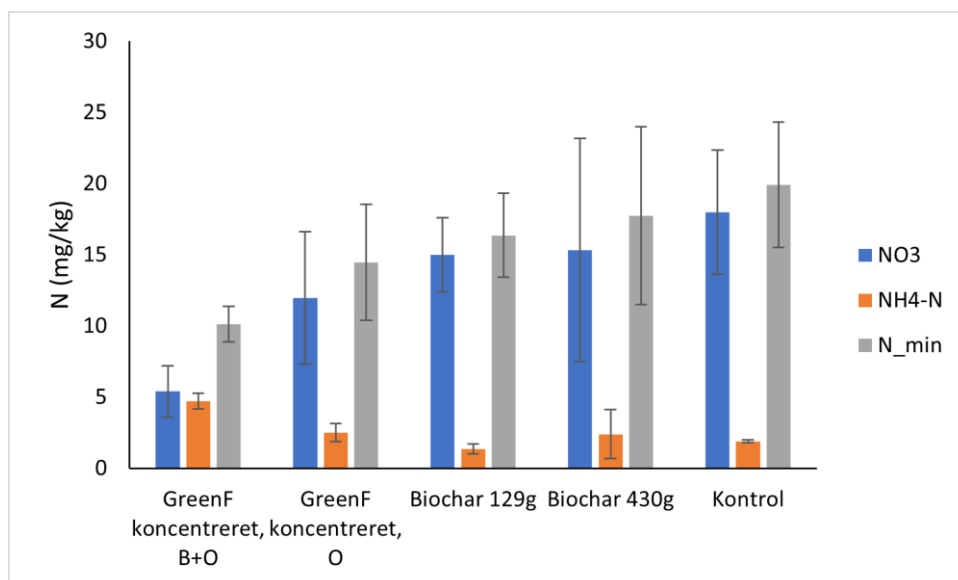
Figur 4. Kumulativ N₂O udledning fra forsøg 3.



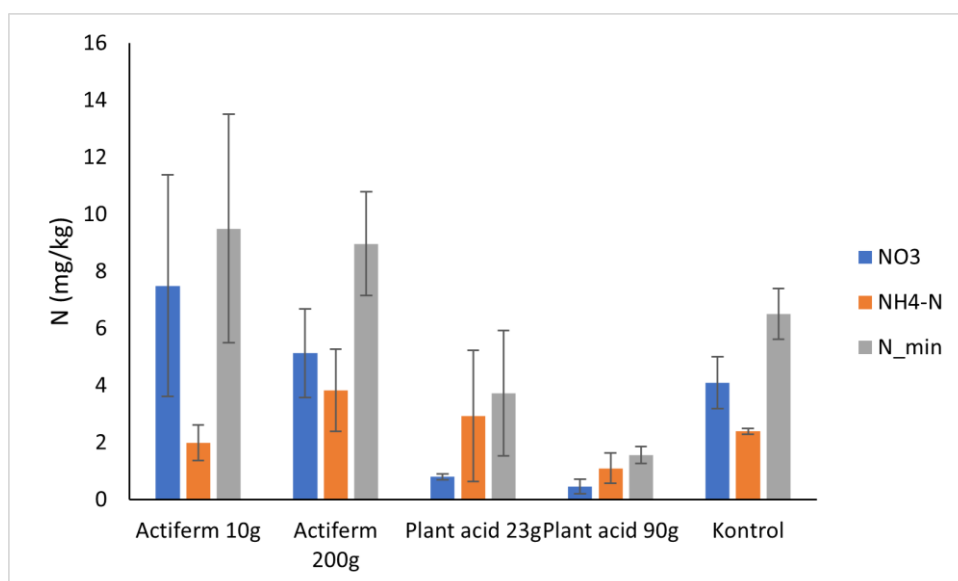
Figur 5. Kumulativ N₂O udledning fra forsøg 4.



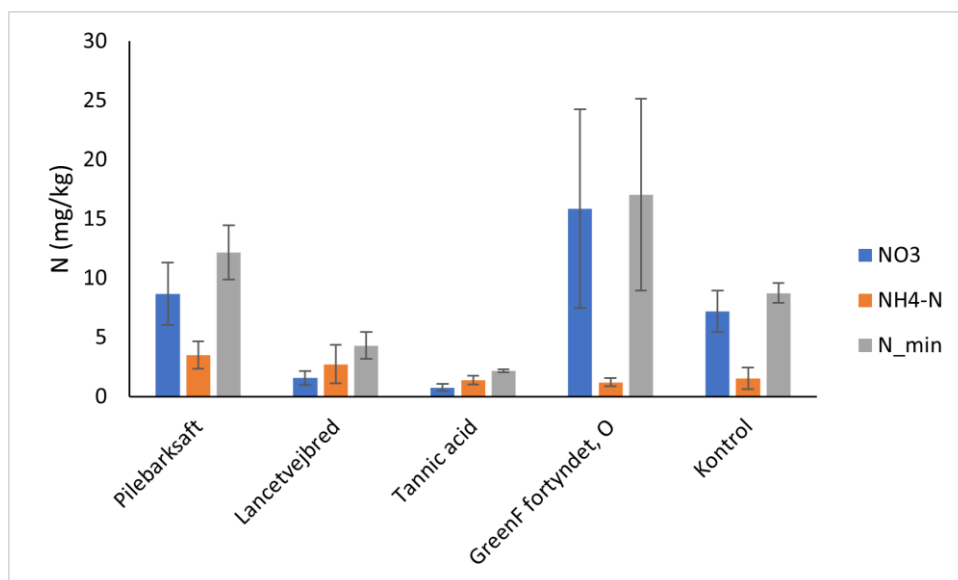
Figur 6. Mineraliseret N ved afslutning af forsøg 1. Usikkerheder er angivet som standardafvigelser for en stikprøve.



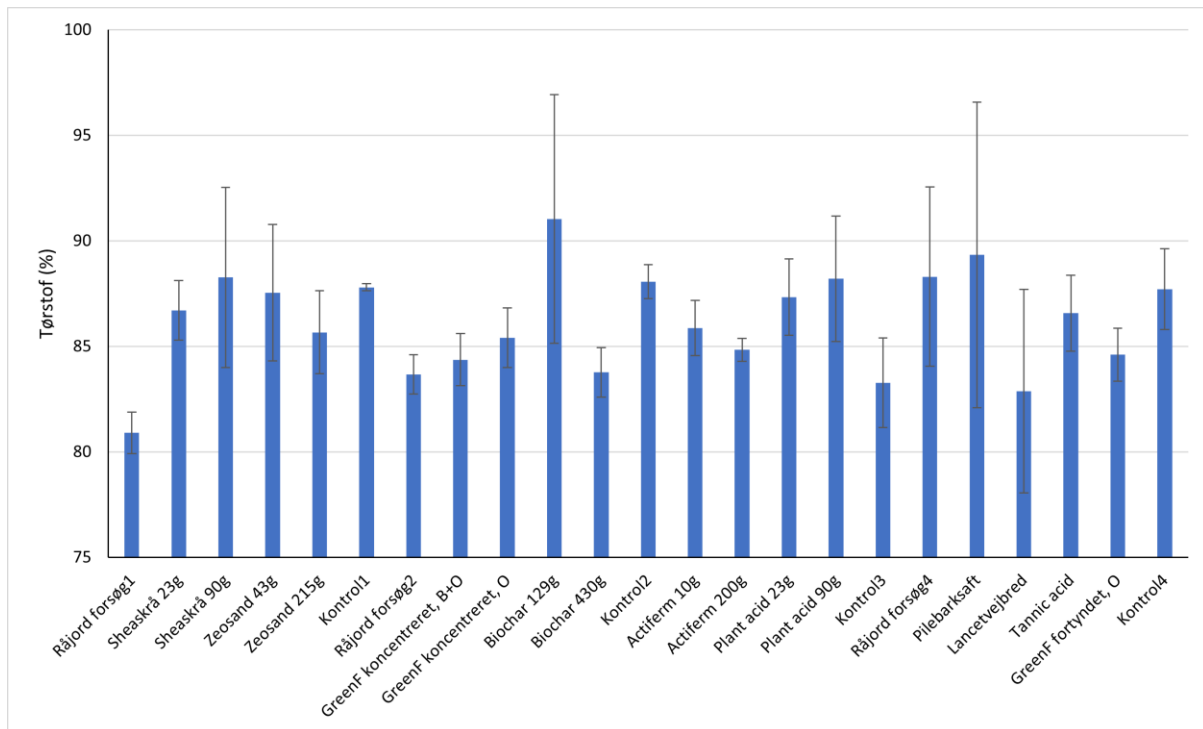
Figur 7. Mineraliseret N ved afslutning af forsøg 2. Usikkerheder er angivet som standardafvigelser for en stikprøve. B+O er blandet + overridslet, O er overridslet



Figur 8. Mineraliseret N ved afslutning af forsøg 3. Usikkerheder er angivet som standardafvigelser for en stikprøve.



Figur 9. Mineraliseret N ved afslutning af forsøg 4. Usikkerheder er angivet som standardafvigelser for en stikprøve.



Figur 10. Tørstof indhold i jorden fra de fire forsøg. Råjord refererer til den jorden som blev brugt til alle 16 kamre før forsøgsstart. Behandlinger og kontroller angiver tørstof indholdet ved forsøgenes afslutning (efter 14 dage). Kontrol1, Kontrol2, Kontrol3 og Kontrol4 henviser til kontrollerne i hhv. forsøg1, forsøg2, forsøg3 og forsøg4. Der blev ikke taget råjord prøve før forsøg 3. Usikkerheder er angivet som standardafvigelsen for en stikprøve. B+O er blandet + overridslet, O er overridslet



Tabel 5. Gas reduktioner. Røde tal indikerer statistisk signifikant forskel fra kontrol med signifikans niveau = 0.05. N/A henviser til at data ikke kunne analyseres. Usikkerheder er angivet som standardafvigelsen for en stikprøve.

Produkt	Reduktion			
	N ₂ O	CH ₄	CO ₂	NH ₃
Sheaskrå 23 g	35±39	5.2±4.5	-17±23	N/A
Sheaskrå 90 g	32±16	1.8±6.9	-80±15	N/A
Zeosand 43 g	9.4±21	-0.7±7.3	4.1±8.1	N/A
Zeosand 215 g	-2.2±21	0.5±7.6	-4.5±9.8	N/A
GreenF Koncentreret blandet+overridslet	27±6.7	-2.7±3.8	-64±31	27±28
GreenF Koncentreret overridslet	3.7±12	2.4±3.8	-37±32	19±35
Biochar 129 g	-68±52	-43±35	-16±10	-5.6±58
Biochar 430 g	-63±11	-95±10	-14±11	-18±56
Actiferm 10 g	-0.5±15	3.4±3.1	-15±18	6.4±23
Actiferm 200 g	-23±22	-0.8±3.9	-42±17	7.2±22
Plant acid 23 g	42±13	2.3±2.9	-59±26	-57±82
Plant acid 90 g	52±7.6	-5.0±3.9	-81±24	-3.8±19
Pilebarkekstrakt 90g	-71±25	-2.2±3.4	-20±16	57±20
Lancetvejbred 80g	-134±25	-1.7±1.9	267±43	20±36
Tannic acid 90g	-61±25	-10±2.5	-145±30	5.6±58
GreenF fortyndet overridslet	-90±42	0.3±1.2	-1.9±19	-77±176

Opsummering:

Der bør på baggrund af screeningsforsøgene laves nærmere undersøgelser af udvalgte nitrifikationshæmmere. De mest interessante nitrifikationshæmmere var plant acid og sheaskrå, som begge havde en reducerende effekt på N₂O udledning. Den reducerende N₂O udledning kan højst sandsynligt tilskrives en antimikrobiel effekt på de nitrificerende og denitrificerende mikroorganismer, men yderligere forsøg skal udføres for at bekræfte denne hæmningsmekanisme. Effekten af ren tannic acid bør også undersøges yderligere da resultaterne fra en 50% tannic acid blanding var tvetydig. Det bør i fremtidige forsøg sikres at fugtigheden af jorden er ens ved gentagne forsøg, samt ens kamrene imellem, da fugtighed har stor betydning for N₂O produktionen. Derudover skal effekten af sollys og beplantning undersøges for at kunne vurdere nitrifikationshæmmerne under mere naturlige forhold.

Litteratur:

1. Bhatta R, Saravanan M, Baruah L, Prasad CS. Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production. J Appl Microbiol. 2015;118: 557–564. doi:10.1111/jam.12723
2. Dalby FR, Svane S, Sigurdarson JJ, Sørensen MK, Hansen MJ, Karring H, et al. Synergistic Tannic Acid-Fluoride Inhibition of Ammonia Emissions and Simultaneous Reduction of Methane and Odor Emissions from Livestock Waste. Environ Sci Technol. 2020;54: 7639–7650.
3. Al-Jumaili WS, Goh YM, Jafari S, Rajion MA, Jahromi MF, Ebrahimi M. An in vitro study on the ability of tannic acid to inhibit methanogenesis and biohydrogenation of C18 PUFA in the rumen of goats. Ann Anim Sci. 2017;17: 491–502. doi:10.1515/aoas-2016-0059
4. Thers H, Abalos D, Dörsch P, Elsgaard L. Nitrous oxide emissions from oilseed rape cultivation were unaffected by flash pyrolysis biochar of different type, rate and field ageing. Sci Total Environ. 2020;724. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138140
5. Li X, Lin C, Wang Y, Zhao M, Hou Y. Clinoptilolite Adsorption Capability of Ammonia in Pig Farm. 2010;2: 1598–1612. doi:10.1016/j.proenv.2010.10.171
6. Jakkula VS, Wani SP. Zeolites : Potential soil amendments for improving nutrient and water



- use efficiency and agriculture productivity. *Sci Rev Chem Commun.* 2018;8: 1–15.
7. Hu C, Qi Y. Effective microorganisms and compost favor nematodes in wheat crops. 2013; 573–579. doi:10.1007/s13593-012-0130-9
 8. Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K, Yokota H. Tukey–Kramer Method BT. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K-H, Yokota H, editors. *Encyclopedia of Systems Biology.* New York, NY: Springer New York; 2013. p. 2304. doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_101575