

De effecten van continue  
en piekbelasting met  $H_2S$   
op de groei, de in vitro  
NADH oxydatie capaciteit  
en het zwavelmetabolisme  
van spinazie



door: Petra van der Zanden  
datum: juni 1992

**INHOUDSOPGAVE**

pag.

<b>VOORWOORD</b>	3
<b>SAMENVATTING</b>	4
<b>INLEIDING</b>	5
NORMstelling voor H <sub>2</sub> S	5
Effect H <sub>2</sub> S op de plant	7
Fytotoxiciteit	
Depositie	7
Effecten op de fysiologie	8
Vraagstelling	9
<b>MATERIAAL EN METHODE</b>	11
Plantensoort	11
Behandeling 1	11
Behandeling 2	12
Behandeling 3	12
Behandeling 4	12
Behandeling 5	13
Behandeling 6	13
Begassing	13
Groei	16
Transpiratie	16
In vitro NADH oxydatie capaciteit	16
Wateroplosbare niet-eiwitgebonden sulfhydrylverbindingen	17

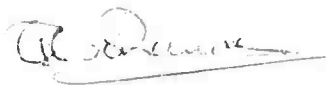
Rijksuniversiteit Groningen  
Bibliotheek Biologisch Centrum  
Kerklaan 30 — Postbus 14  
9750 AA HAREN

	pag.
<b>RESULTATEN EN DISCUSSIE</b>	19
Resultaten en discussie groeiproef	19
Resultaten en discussie van de experimenten waarin de in vitro NADH oxydatie capaciteit en de sulfhydrylge- haltes werden bepaald	21
Experiment 1	21
Experiment 2	24
Experiment 3	27
Experiment 4	30
Experiment 5	33
Eindconclusies m.b.t. de piekbegassingsexperimenten	36
 <b>LITERATUUR</b>	 39
 Bijlage 1. Samenvatting colloquium "Criteria luchtkwali- teitsnormering zwaveldioxide"	 43
Bijlage 2. Samenstelling Hoagland voedingsoplossing	51
Bijlage 3. Uitwerking RGR berekening	52
Bijlage 4. Uitwerking transpiratie berekening	54
Bijlage 5. Uitwerking NADH bepaling	57
Bijlage 6. Toelichting op de gebruikte statistiek	59

## VOORWOORD

In het kader van mijn doctoraalfase van de studie Biologie, met specialisatierichting Milieubiologie, aan de Rijksuniversiteit Groningen, heb ik mijn eerste doctoraalonderwerp uitgevoerd bij de vakgroep Biologie van Planten, afdeling Plantenfysiologie. Het betrof een onderwerp in samenwerking met de Wetenschapswinkel getiteld "Piekbelastingen : luchtverontreiniging en planten" (1).

Via deze weg wil ik iedereen bedanken voor de hulpvaardigheid, vriendelijkheid en gezelligheid die ik tijdens mijn verblijf op de afdeling heb ondervonden. In het bijzonder wil ik Luit de Kok en Attie Bos bedanken voor niet alleen de vlotte en doeltreffende begeleiding van dit onderwerp, maar ook voor dat van het hieraan voorafgaande colloquium.



Petra van der Zanden

juni '92

Rijksuniversiteit Groningen  
Bibliotheek Biologisch Centrum  
Kerklaan 30 — Postbus 14  
9750 AA HAREN

## SAMENVATTING

De luchtkwaliteitsnormeringen voor  $H_2S$  met betrekking tot stank en de  $H_2S$ -concentratie zelf, worden uitgedrukt in percentielwaarden. Zodoende kunnen er op de dagen waarop de norm geen betrekking heeft (onbeperkt hoge) piekbelastingen optreden. Begassing van spinazie (*Spinacia oleracea* L. cv. Estivato) met 210 en 500 ppb  $H_2S$  gedurende 14 dagen (dag/nacht 12/12 uur), leidde tot een significante daling van de opbrengst en de RGR. Na 48 uur begassing met dezelfde concentraties werd een daling van de in vitro NADH oxydatie capaciteit waargenomen. Begassing met de bij de 210 ppb  $H_2S$  horende piekconcentratie van 500 ppb, gedurende 5 pieken per dag van elk 2 uur, had op bovengenoemde factoren geen effect. Echter wanneer de daglengte 24 in plaats van 12 uur was, werd er als gevolg van de piekbelasting wel een remming van de NADH oxydatie capaciteit waargenomen. Deze was iets kleiner dan de remming welke veroorzaakt werden door de concentraties 210 en 500 ppb. Piekbelastingen van 500 ppb die elk 1 in plaats van 2 uur duurden, hadden net als de bijbehorende continue begassingsconcentratie van 100 ppb geen effect op de in vitro NADH oxydatie capaciteit (nog steeds bij continu licht). Het SH-gehalte in de spruit steeg wel als gevolg van de piekbelastingen van 1 of 2 uur, maar deze was steeds lager dan dat wat in de spruit aanwezig was na begassing met de bijbehorende continue concentraties van 100 resp. 210 ppb  $H_2S$ . Ook nu waren de effecten maximaal nadat 48 uur begassing had plaatsgehad en beïnvloedde het instellen van een dag/nacht ritme (12/12 uur) deze effecten niet. Kennelijk was het niet zo, dat wanneer dosis \* tijd gelijk was (piekbelasting tegenover bijbehorende continue begassing), ook vergelijkbare effecten voor wat betreft de groei, de in vitro NADH oxydatie capaciteit en het SH-gehalte optraden. In de uren tussen de pieken had de plant kennelijk tijd genoeg om zich te herstellen en zodoende een volgende piek te verwerken, zonder dat dit grote schade tot gevolg had. Wat  $H_2S$  betreft leek het optreden van piekbelastingen in de atmosfeer dan ook zeker geen grotere gevolgen te hebben dan welke werden veroorzaakt door de veel langer durende continue belastingen. De factor tijd leek belangrijker te zijn dan de factor concentratie voor de teweeggebrachte effecten in spinazie.

## INLEIDING

Zwavelwaterstof ( $H_2S$ ) komt niet alleen in de atmosfeer via natuurlijke bronnen, zoals vulkanisme en anaërobe verbranding van zwavelbevattend organisch materiaal, maar ook antropogene bronnen leveren een niet onbelangrijke bijdrage (10, 27). Enkele voorbeelden van de laatste categorie zijn de aardolie- en steenkoolverwerkende industrie, rioolwaterzuiveringsinstallaties, intensieve veehouderijen en het verkeer (23, 24). Als gevolg van deze processen bedraagt de totale emissie van  $H_2S$  zo'n 2000 ton per jaar (23).

### Normstelling voor $H_2S$

$H_2S$  levert voor de mens hoofdzakelijk een probleem op in de vorm van stank. Bij klachten over stank komt het psychisch effect (hinder) het meest naar voren, maar soms worden ook lichamelijke effecten van stank ondervonden, zoals misselijkheid, slapeloosheid, overgeven, hoofdpijn en ademhalingsstoornissen. Het hinderaspect overheerst vooral bij lage concentraties. Dit was dan ook het aangrijpingspunt om stank aan te pakken (23). Gezien het aantal klachten over stank (80-90 % van alle klachten over luchtverontreiniging) en de resultaten van enquêtes over beleving van stank, dient stankoverlast beschouwd te worden als een aanzienlijk milieuprobleem op diverse plaatsen in Nederland (26). Het treed op vele diffuus over Nederland verspreide locaties op. Anders dan voor individuele luchtverontreinigende stoffen kan stank niet worden bepaald met fysische en of chemische meetmethoden. Dit maakt het vaststellen van de mate waarin stank optreedt en de bestrijding ervan moeilijk (22). Ten einde het hinderaspect te operationaliseren is objectivering en kwantificering van de stankhinder die de bevolking ondervindt noodzakelijk (26). Kwantificering van de stankbeleving kan op 2 verschillende manieren gebeuren:

- 1) Direct: de bevolking vragen naar de beleving;
- 2) indirect: door eerst de concentratie van stank te bepalen (uitgedrukt in geureenheden) en dan de concentratie koppelen aan de beleving. Hieraan kan bovendien met behulp van een verspreidingsmodel het verband tussen de stankconcentratie en uitworp bij de bronnen worden gelegd (24).

In '87 ligt de nadruk van het beleid dan ook op het formuleren van een stankbelevingsnorm (29). Gekozen werd voor de toepassing van methode 1), daar geen goede instrumenten aanwezig waren om geureenheden te meten (olfactometers) (28, 29). Dit werd uitgevoerd met bevolkingspanels in de woonomgeving rond

het Rijnmond gebied (26, 30). Bevolkingspanels zijn groepen mensen die, na selectie en op vrijwillige basis, bereid zijn regelmatig naar een vaste plaats buitenshuis te gaan om een oordeel te geven over de mate van hinderlijkheid van de omgevingslucht (22). Hierbij werd gebruik gemaakt van een door het Psychologisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit Utrecht (prof. dr. E.P. Köster) speciaal ontwikkelde meetschaal die bestaat uit een voorvraag ("Neemt u een geur waar?") en 5 antwoord mogelijkheden op de hoofdvraag (Is de geur die u nu waarneemt niet hinderlijk, een beetje hinderlijk, hinderlijk, erg hinderlijk of heel erg hinderlijk?) (22). Ondanks dit onderzoek is het tot op heden nog niet mogelijk geweest een geurniveau vast te stellen (dus een ontwerp milieukwaliteits-eis voor stankbeleving), dat voor het merendeel van de bevolking een leefbaar woonklimaat waarborgt. Het belevingsonderzoek zal worden voortgezet (26, 30).

In Publicatiereeks Lucht nr. 11 getiteld "Geurnormering" wordt echter wel een waarde voorgesteld voor een stankconcentratie-norm (23). Deze is onder andere gebaseerd op grond van ervaring met de toepassing van de richtlijn voor de intensieve veehouderij. De uurgemiddelde concentratie van 1 geureenheid per m<sup>3</sup> mag gedurende niet meer dan 0,5 % van de tijd per jaar (= 44 uur per jaar) overschreden worden. Dit is het zogenaamde 99,5 onderschrijdingspercentiel (22). Één geureenheid per m<sup>3</sup> is die concentratie, die door 50 % van het bevolkingspaneel van schone lucht wordt onderscheiden. De norm houdt in, dat 44 uur per jaar 50 % van de bevolking tijdens deze periode de stank ook echt als hinderlijk aanvaardt (24). De hier voorgestelde norm heeft alleen betrekking op stank veroorzaakt door inrichtingen en activiteiten en gelden alleen voor de bebouwde kom, stankgevoelige objecten (zoals ziekenhuis, sanatorium, internaat etc.) en objecten voor dag- en verblijfsrecreatie (zoals bungalowpark, camping etc) (22, 24, 25). Voor overige gebieden zal echter rekening gehouden kunnen worden met andere omstandigheden. De mate van afwijking van de stankconcentratienorm tot aan een bepaalde bovengrens is per geval de bevoegdheid van het vergunningsverlenende gezag (23). De stankconcentratienorm kan met behulp van een verspreidingsmodel (nl. het Lange Termijn Frequentie Distributie -LTFD- model) worden omgezet in een berekende norm voor de emissie van inrichtingen en activiteiten (24, 22). Bovengenoemde norm werd in het IMP-L (Indicatief Meerjaren Programma Lucht) '85-'89 als interim-grenswaarde voor nieuwe installaties gepubliceerd (23). Echter voor bestaande installaties werd een 98-percentiels stankconcentratienorm van 1 geureenheid per m<sup>3</sup> voorgesteld, wat bete-



kent dat 72 in plaats van 44 uur per jaar de uurgemiddelde concentratie van 1 g.e.  $m^{-3}$  overschreden mag worden (22).

Tevens geldt de sinds het IMP-L '84-'88 voorgestelde interimgrenswaarde voor de stof  $H_2S$  zelf. Dit is een 99,5-percentage-waarde van 2,5  $\mu g m^{-3}$  (uurgemiddelde concentratie) (23, 24). Echter  $H_2S$  wordt niet gemeten in het kader van het L.M.L. (Landelijk Meetnet Luchtkwaliteit), zodat kennis met betrekking tot het voorkomen van deze stof veelal slechts fragmentarisch is en op incidentele metingen berust (23).

De interimgrenswaarden met betrekking tot stank en de  $H_2S$  concentratie zelf worden, vooruitlopend op wettelijke vaststelling van de waarden (= milieukwaliteitseis), vastgelegd in IMP's. Een grenswaarde beoogt met name de gezondheid van de mens te beschermen (3, 20). Echter niet alleen de mens, maar ook planten ondervinden hinder van  $H_2S$ . Ter bescherming van het milieu kunnen (strengere) richtwaarden worden opgesteld. Dit is echter voor  $H_2S$  tot nu toe nog niet gebeurd.

## Effecten van $H_2S$ op de plant

### Fytotoxiciteit

$H_2S$  is voor de plant fytotoxisch, wat bleek uit het feit, dat bgassing van klaver (*Trifolium pratense* L.) met 250 ppb  $H_2S$  gedurende 2 weken een daling van de groei met 32 % tot gevolg had (17). Begassing met 0.15 en 0.30  $\mu l l^{-1}$  (wat overeenkomt met 150 resp. 300 ppb)  $H_2S$  van spinazie (cv. Monosa) had remming van de RGR, gemeten over een periode van 2 weken, met 20 resp. 35 % tot gevolg (19).

### Depositie

Tijdens blootstelling van spinazie (cv. Estivato) aan 0.24 en 0.74  $\mu l l^{-1}$   $H_2S$  werd een hoge flux waargenomen in het licht en een lage flux in het donker (11). Er bleek een directe relatie te bestaan tussen de transpiratiesnelheid en deze  $H_2S$  flux, zodat de opname van  $H_2S$  vnl. via de stomata plaatshad.  $H_2S$  bleek geen invloed te hebben op de transpiratiesnelheid van  $H_2O$  door de stomata (11, 17).

Absoptie van  $H_2S$  door de spruit was onafhankelijk van de gevoeligheid voor  $H_2S$  van de soort, daar als gevolg van begassing van spinazie (cv. Estivato) en mais (cv. Gelber badischer Landmais) met 750 ppb  $H_2S$  gedurende 12 dagen, 69 % reductie in de groei van spinazie plaatsvond terwijl de groei van mais niet werd geremd. Bij beide planten was de  $H_2S$  flux naar de spruit even groot (11, 10).



## Effecten op de fysiologie

Begassing van spinazie met 250 ppb  $H_2S$  gedurende 24 uur, had een snelle stijging van het gehalte aan water-oplosbare niet-eiwitgebonden sulfhydrylverbindingen (SH) tot gevolg, daar zowel de cysteine (cys) als de glutathion (GSH) concentratie toenam. In de controle planten was het cysteine-gehalte minder dan 12 % van het totale sulfhydrylgehalte in de spruit. GSH (een tripeptide van cys-glu-gly, glu = glutamine, gly = glycine) was de voornaamste zwavelverbinding. Echter na begassing, was het cys-gehalte vertienvoudigd en kon zelfs 50 % van het totale SH-gehalte bevatten (6, 8, 9, 10, 12, 14). Het GSH-gehalte verdubbelde slechts. Na 2 dagen begassing bereikte het sulfhydrylgehalte een maximaal niveau en was het 3 tot 4 keer zo groot in vergelijking met dat in de controle planten (8, 18). Deze accumulaties zouden plaatsvinden zodra de gereduceerde zwavelvoorziening groter was dan de metabolische behoefte (6, 18, 31). De omzetting van  $H_2S$  naar cys en GSH is schematisch weergegeven in Fig. 1 (5, 13).

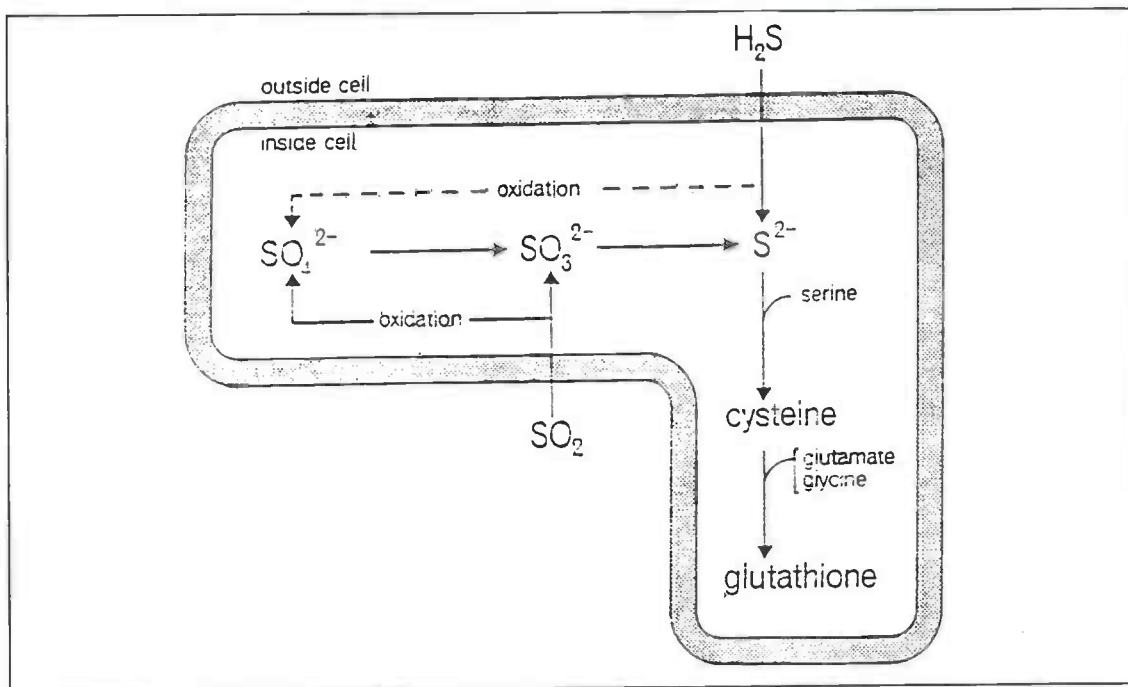


Fig. 1. Schematische weergave van de omzetting van  $H_2S$ , dat de spruit binnendringt, tot cysteine en glutathion. Ook gereduceerde S afkomstig van  $SO_2$  kan uiteindelijk ingebouwd worden in glutathion.

De SH-accumulatie als gevolg van begassing in het donker was even groot dan die in het licht (6, 18, 31).

Het gebruik van de transpiratiesnelheid voor  $H_2O$  als schatting voor de  $H_2S$ -opname door de plant (zie "Depositie") lijkt alleen goede resultaten te geven in het begin van de begassingsperiode, daar dan als gevolg van het snelle metabolisme cys en GSH werden opgehoopt en zodoende de  $H_2S$ -concentratie in de plant verwaarloosbaar klein bleef (4, 10, 17, 19). Echter zodra het metabolisme en dus de  $H_2S$ -flux een maximum had bereikt, zou de geschatte  $H_2S$ -opname te hoog uitvallen wat een onderschatting van het percentage  $H_2S$  dat werd omgezet in SH-verbindingen tot gevolg had (5, 9, 11, 12, 14, 17, 19).

Begassing met 0.15 en 0.30  $\mu l l^{-1}$   $H_2S$  van spinazie (cv. Monosa) had niet alleen remming van de RGR, gemeten over een periode van 2 weken tot gevolg (zie boven), maar verliep parallel en was ca. even groot als de remming van de in vitro NADH oxydatie capaciteit (2, 5, 12, 19).  $H_2S$  zou de NADH oxyderende enzymen remmen (in vitro) (8<sup>a</sup>, 19). De in vitro NADH oxydatie capaciteit leek een goede maat te zijn voor het vroegtijdig signaleren van groeireductie in planten die aan  $H_2S$  worden blootgesteld (2, 5, 12, 19).

Echter kennelijk is niet de hoeveelheid (flux)  $H_2S$  wat de spruit binnendringt de oorzaak van het fytotoxisch zijn van dit gas, wat tot uiting kwam in de gereduceerde groei (zie "Depositie"). Het doordringen van sulfide tot in het meristematisch weefsel, de plaats in de cel waar toxische producten worden gevormd en de interne sulfide-concentratie in de plant zijn mogelijke oorzaken van deze geremde groei (5, 10).

### Vraagstelling

Zoals boven al staat beschreven plegen de hoogten van de grens- (en richt-) waarden te worden uitgedrukt in zogenaamde percentielwaarden (en niet in concentraties). Een P-percentiel onderschrijdingsnorm met als basisperiode van bijvoorbeeld een jaar betekent dus, dat gedurende P procent van de basisperiode de concentratie in de buitenlucht beneden het gestelde niveau dient te blijven (20). Gedurende de resterende tijd (100 - P) mag de norm overschreden worden. Op deze dagen heeft de norm dan geen betrekking. Het gebruik van percentielwaarden laat de mogelijkheid open dat zich piekbelastingen voordoen die ongewenste of ontoelaatbare effecten veroorzaken op (o.a.) planten (21). De effecten van deze piekbelastingen zijn nog onbekend. Het doel van dit onderzoek was, deze effecten met betrekking tot de transpiratiesnelheid, de (relatieve) groei en de opbrengst, de NADH oxydatie capaciteit en het sulphydryl-gehalte in de spruiten van spinazie (cv. Estivato) te vergelijken met welke worden veroorzaakt door blootstelling aan continue lage

begassingsconcentraties  $H_2S$ . De totale blootstellingsconcentratie per behandeling was gelijk zodat goede vergelijking van de effecten kon plaatshebben.

Er werd begast met  $H_2S$ , daar deze geen invloed had op de stomata en van de effecten van dit gas op bovengenoemde factoren al veel bekend was. Voor  $H_2S$  zijn echter nog geen wettelijke normen vastgelegd in tegenstelling tot een gas als  $SO_2$ . Voor de totstandkoming van deze normen zie "Bijlage 1". Maar in verband met bovenstaande overwegingen werden alle experimenten met  $H_2S$  uitgevoerd.

## MATERIAAL EN METHODE

### Plantensoort

Het was in eerst instantie de bedoeling met Rode klaver (*Trifolium pratense*) te werken, daar dit een in het veld algemeen voorkomende plantensoort is, in tegenstelling tot spinazie. Echter tijdens de bepalingen van de in vitro NADH oxydatie capaciteit en het SH-gehalte in de plant trad polyfenoloxylatie op wat bruinkleuring van de extracten veroorzaakte. Deze behoren echter helder en kleurloos te zijn, willen bovengenoemde bepalingen kunnen worden uitgevoerd. Gezien het feit, dat de vraagstelling van dit onderzoek niet was om uit te vinden hoe de NADH oxydatie capaciteit en het SH-gehalte in klaver bepaald konden worden, werd besloten niet verder te werken met deze planten, maar over te schakelen op het gebruik van spinazie (*Spinacia oleracea* L. cv. Estivato). De omstandigheden tijdens de kweek en de begassing van de planten was niet altijd gelijk. Hieronder worden deze verschillende behandelingen weergegeven.

### Behandeling 1:

Spinazie werd gezaaid in kiembakken met niet steriele grond. Deze bakken werden vervolgens in de klimaatkamer geplaatst waarin de volgende condities heersten:

Dag / nacht temperatuur	= 25 / 18 °C;
daglengte	= 18 uur, van 6.00 - 24.00 uur;
lichtintensiteit	= 210 - 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;
relatieve vochtigheid	= 40 - 50 %.

Op de derde dag werden de glasplaten verwijderd die tot dan toe over de kiembakken hadden gelegen. Na 6 dagen werden de plantjes op plastic potjes gezet (diameter 9 cm, niet steriele grond), per potje 2 plantjes, waarna ze werden overgeplaatst naar de begassingstonnen. Zodra alle planten erin stonden werd de begassing gestart. In de tonnen heersten de volgende condities:

Dag / nacht temperatuur	= 20 $\pm$ 1 °C;
daglengte	= 18 uur, van 6.00 - 24.00 uur;
lichtintensiteit	= 190 - 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;
relatieve vochtigheid	= 48 $\pm$ 10 %;
begassingsconcentraties	= 0, 250 ppb H <sub>2</sub> S;
tijdstip Hoagland <sup>1</sup>	= op derde dag van de begassing.

---

<sup>1</sup> Aan elk potje in de ton wordt 20 ml  $\frac{1}{4}$  Hoagland voedingsoplossing toegevoegd. Voor de samenstelling hiervan zie "Bijlage 2".

### Behandeling 2:

Idem "Behandeling 1" met uitzondering van enkele condities in de begassingstonnen:

Dag / nacht temperatuur	= $23 \pm 1$ °C;
daglengte	= 16 uur, van 6.00 - 22.00 uur;
begassingsconcentraties	= 0, 100, 250 & 500 ppb H <sub>2</sub> S;
tijdstip Hoagland	= op zesde dag van de begassing.

### Behandeling 3:

Idem "Behandeling 2" met uitzondering van enkele condities in de klimaatkamer:

Daglengte	= 16 uur, van 6.00 - 22.00 uur;
lichtintensiteit	= 180 - 220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;
relatieve vochtigheid	= 50 - 60 %.

Na 6 dagen werden de plantjes op de potjes gezet, per potje 4 of 5 plantjes, waarna ze werden overgeplaatst naar de begassingstonnen.

Voor de condities in de begassingstonnen zie "Behandeling 2" met uitzondering van:

Daglengte	= 24 uur;
begassingsconcentraties	= 0, 100 & 500 ppb H <sub>2</sub> S.

### Behandeling 4:

Spinazie werd direct gezaaid in potjes met niet steriele grond in plaats van in kiembakken. De potjes werden vervolgens in de klimaatkamer gezet, waarin de condities hetzelfde waren als beschreven staat bij "Behandeling 3". Na 7 dagen werden de potjes, waarin 6 plantjes zaten, in de tonnen gezet zodat de begassing kon worden gestart. De condities in de tonnen waren hetzelfde dan die vermeld staan bij "Behandeling 3" met uitzondering van:

Begassingsconcentraties	= 0, 100 & 500 ppb H <sub>2</sub> S continu en 500 ppb H <sub>2</sub> S gedurende periodes van 1 uur (piekbelasting);
verspreiding pieken	= 7.00 - 8.00 uur; 11.45 - 12.45 uur; 16.30 - 17.30 uur; 21.30 - 22.30 uur; 2.15 - 3.15 uur;

Tussen twee "piekuren" was de begassingsconcentratie steeds 0 ppb. Met behulp van een tijd klok en een flowmeter die achter de klep van de "piekton" werd geschakeld, konden de piekuren op de geplande tijdstippen totstandkomen. De tijd klok zorgde er namelijk voor, dat bijvoorbeeld tussen 7.00

en 8.00 uur de stroom uitgeschakeld werd, waardoor de flowmeter openstond en gastoevoer naar de ton plaats kon hebben (de flowmeter nam de functie van de slecht werkende klep over). Tussen 8.00 en 11.45 uur werd de stroom met behulp van de tijd klok weer ingeschakeld, waardoor de flowmeter dicht ging en dus de gastoevoer naar de ton werd stop gezet. Naar aanleiding van de uitkomsten in de eerdere experimenten met behandeling 1 t/m 3 werd gekozen voor een piekconcentratie van 500 ppb (zie ook "Resultaten"). Blootstelling aan 500 ppb gedurende 5 uur was ongeveer gelijk aan blootstelling aan 100 ppb gedurende 24 uur. Ter vergelijking van de teweeggebrachte effecten werd tevens continu begast met 500 ppb.

tijdstip Hoagland = op eerste dag van begassing.

#### Behandeling 5:

Idem "Behandeling 4" met uitzondering van de in de tonnen plaatsvindende begassing:

Begassingsconcentraties = 0, 210 & 500 ppb H<sub>2</sub>S continu en 500 ppb H<sub>2</sub>S gedurende periodes van 2 uur (piekbelasting);

verspreiding pieken = 7.00 - 9.00 uur;  
11.45 - 13.45 uur;  
16.30 - 18.30 uur;  
21.30 - 23.30 uur;  
2.15 - 4.15 uur.

Blootstelling aan 500 ppb gedurende 10 uur per dag (5 pieken van 2 uur) komt overeen met blootstelling aan 210 ppb gedurende 24 uur per dag (continue blootstelling).

#### Behandeling 6:

Idem "Behandeling 2" met uitzondering van het feit, dat de plantjes direct in potjes werden gezaaid en de daglengte die in de klimaatkamer heerste:

Daglengte = 16 uur, van 6.00 - 22.00 uur.

De omstandigheden in de tonnen waren gelijk aan die vermeld onder "Behandeling 5" echter:

Daglengte = 12 uur, van 5.30 - 17.30 uur, zodat de helft van de pieken in het licht en de anderen helft in het donker plaatshad.

#### Begassing

De planten werden begast met verschillende concentraties H<sub>2</sub>S (0, 100, 210 & 500 ppb en piekbelastingen à 500 ppb). Dit had plaats in 2 tot 4 begassingstonnen, zoals beschreven is door

Maas et al. (16) en waarvan de opstelling staat afgebeeld in Fig. 2.



Fig. 2. Opstelling van de begassingstonnen. De glasplaten die de tonnen van boven afdekten en waarboven de lampen hingen, werden met behulp van een ventilator gekoeld. Koelwater zorgde ervoor, dat de temperatuur in de tonnen niet te hoog werd.

Een doorsnede van een begassingston staat in Fig. 3 (5).



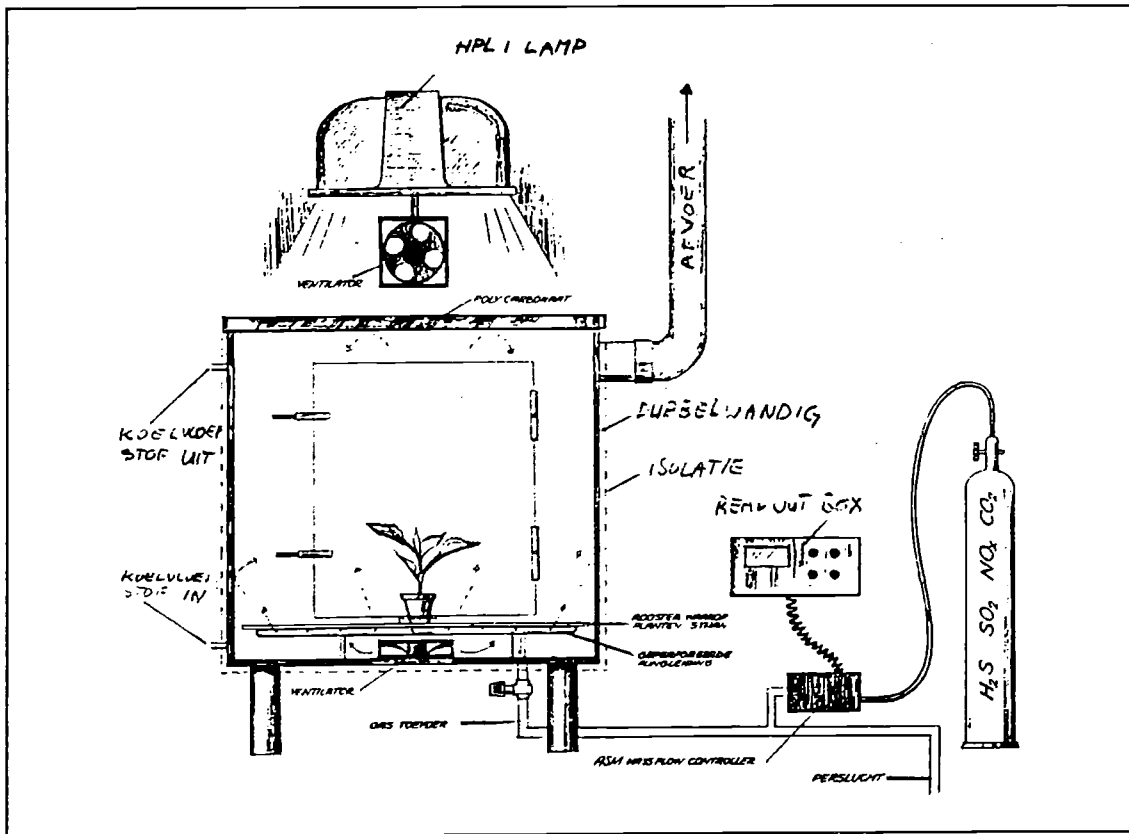


Fig. 3. Doorsnede van een begassingston die opgesteld staat zoals in Fig. 2. is afgebeeld.

## Groei

De RGR (Relative Growth Rate) werd bepaald aan planten die gedurende 2 weken werden blootgesteld aan 0, 210 en 500 ppb H<sub>2</sub>S continu en pieken van 500 ppb H<sub>2</sub>S gedurende 2 uur (zie "Behandeling 6"). De kweek van de spinazie had echter in kiembakken plaats en niet direct in de potjes. Op de 7de dag werden in elk potje 2 plantjes gepoot en 20 ml  $\frac{1}{4}$  Hoagland toegevoegd. De begassing werd gestart zodra alle planten in de tonnen stonden. Van 27 overgebleven spinazie plantjes werd het versgewicht bepaald ( $9 * (n = 3)$ ). Tevens werd op dezelfde manier het versgewicht van de begaste planten bepaald, nadat die 7 resp. 14 dagen in de tonnen hadden gestaan. De RGR in  $g^{-1} g^{-1} dag^{-1}$  kon als volgt worden berekend:

$$RGR = \frac{\ln(\text{eindgewicht}) - \ln(\text{begingewicht})}{(t_2 - t_1)}$$

Voor een voorbeeld berekening van de RGR zie "Bijlage 3".

## Transpiratie

Het was de bedoeling de H<sub>2</sub>S-geleiding van de spruit te bepalen met behulp van een zwavelmonitor, die vorig jaar werd aangeschaft. Echter, de installatie hiervan duurde veel langer dan voorzien, zodat de metingen als volgt werden verricht. Per ton werden een aantal potten met 1 plant luchtdicht verpakt in parafilm en aluminiumfoelie. Hiervan werd het gewicht bepaald. Na een verblijf van 24 uur in een ton waar de concentratie H<sub>2</sub>S 0, 500 ppb of 500 ppb in 5 pieken van 2 uur was (zie "Behandeling 6") werd niet alleen opnieuw het gewicht van de verpakte pot met de plant bepaald, maar ook het versgewicht van het plantje zelf. De afname van het gewicht in de tijd was een maat voor de transpiratie van het plantje, dus voor de efflux van waterdamp ( $q(H_2O)$ ) door de stomata. Hieruit kon vervolgens de influx voor H<sub>2</sub>S ( $q(H_2S)$ ) afgeleid worden. De berekening van  $q(H_2S)$  had plaats volgens de methode die beschreven is volgens De Kok et al. (11). Voor een gedetailleerde berekening zie "Bijlage 4".

## In vitro NADH oxydatie capaciteit

De enzym-activiteit in de spruit van spinazie die verantwoordelijk was voor de NADH oxydatie werd bepaald met behulp van een CAM singlebeam spectrofotometer. De bepaling verliep volgens methode 2 zoals beschreven is door Maas et al. (19).

Verder gold, dat de NADH ox. cap in  $\mu\text{mol g FW}^{-1} \text{ h}^{-1}$  als volgt kon worden berekend:

$$\text{NADH OX. CAP.} = \frac{\text{GRADIËNT} * 2.6 * 10 * 60}{0.4 * 5.2}$$

waarin:

Gradiënt	= helling van de lineaire afname van de absorptie (NADH ox. cap.) per minuut. De grootte van deze helling werd bepaald m.b.v. het computerprogramma ENZFITTER;
2.6	= aantal ml aanwezig in cuvet;
10	= verdunningsfactor tijdens extractie;
60	= aantal minuten in één uur;
0.4	= ml extract aanwezig in cuvet;
5.2	= molaire absorptie coëfficiënt van NADH.

De gradiënt die nodig was voor de berekening van de NADH oxydatie capaciteit werd in de eerste twee experimenten (zie pag. 18-24) bepaald over de eerste 5 minuten van de metingen met de spectrofotometer. Dit was niet altijd het lineaire deel. Dat viel soms voor het beginpunt van de metingen, omdat als gevolg van een misverstand, deze pas gestart werd 6 minuten nadat de NADH aan de cuvetten was toegevoegd. Echter na die toevoeging behoren de metingen direct te starten, zodat dan binnen de uiteindelijk verkregen grafiek (over een periode van 15 minuten) de gradiënt van het lineaire deel kon worden bepaald. Om na deze fout toch vergelijking van de NADH ox. cap. mogelijk te maken werd overal de gradiënt over de eerste 5 minuten bepaald en ingevuld in de formule. Zie voor een voorbeeld berekening "Bijlage 5".

#### **Wateroplosbare niet-eiwitgebonden sulfhydrylverbindingen**

Het SH-, GSH- en cys-gehalte in de spruiten van spinazie werd colorimetrisch bepaald (vitatron) op de manier zoals beschreven is door De Kok et al. (9). Na extractie met behulp van een 0.15 % ascorbinezuur oplossing en filtratie, vond 5 minuten incubatie bij 100 °C plaats. Aan het supernatant werd vervolgens, voordat incubatie bij 30 °C plaats had, alleen methylglyoxal toegevoegd. Met behulp van de volgende formule werd het totaal SH-gehalte in  $\mu\text{mol g FW}^{-1}$  berekend:

$$\text{Totaal SH-gehalte} = \frac{[(\text{Abs A} - \text{Abs C}) - \text{Abs E}] * 10 * 2.2}{13.6}$$

Het cys-gehalte in  $\mu\text{mol g FW}^{-1}$  werd bepaald met behulp van de formule:

$$\text{Cys-gehalte} = \text{totaal SH} - \frac{[(\text{Abs B} - \text{Abs D}) - \text{Abs F}] * 10 * 2.2}{13.6}$$

waarin:

- Abs A en B = maat voor de met DTNB reactieve verbindingen die in het supernatant aanwezig waren, zonder of met methylglyoxal;
- Abs C en D = bepaling van de absorptie van het supernatant zonder of met methylglyoxal;
- Abs E en F = blanco's, bepaling van de absorptie van de DTNB oplossing zelf, zonder of met methylglyoxal;
- 10 = verdunningsfactor tijdens extractie;
- 2.2 = totaal volume in de buizen A t/m F;
- 13.6 = molaire absorptie coëfficiënt van sulfhydrylverbindingen (15).

Het GSH-gehalte in  $\mu\text{mol g FW}^{-1} \text{ h}^{-1}$  kon als volgt worden berekend:

$$\text{GSH-gehalte} = \text{totaal SH} - \text{cys-gehalte}$$

Deze sommatie gold alleen in het licht. In donker vond namelijk tevens accumulatie van  $\gamma$ -glutamyl-cysteïne plaats (6, 7, 10, 11).

## RESULTATEN EN DISCUSSIE

Achtereenvolgens zullen de resultaten en discussie behandeld worden van de

- 1) groeiproef;
- 2) vijf experimenten waarin de NADH oxydatie capaciteit en de sulfhydrylgehaltes werden bepaald.

### ad 1) Resultaten en discussie groeiproef

De resultaten zijn weergegeven in tabel 1 en 2. Het experiment duurde in totaal drie weken.

**Tabel 1.** Effect van 0, 210, 500 piek en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de RGR van de spruiten van spinazie (cv. Estivato) die 1 resp. 2 weken werden begast. De pieken duurden elk 2 uur, in totaal werden 5 pieken binnen 24 uur gegeven (zie "Behandeling 6", pag. 11). De RGR werd berekend over een periode van 7 dagen. Weergegeven zijn de gemiddelden van 9 metingen, elk bevatte 3 spruiten  $\pm$  SD. De groeisnelheden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een ANOVA test ( $P < 0.05$  volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6").

leeft. plant [dagen]	begas. duur [dagen]	H <sub>2</sub> S [ppb]	RGR [g/g/dag]
14	7	0	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
14	7	210	0.15 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
14	7	500piek	0.20 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
14	7	500	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
21	14	0	0.11 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
21	14	210	0.08 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
21	14	500piek	0.08 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
21	14	500	0.09 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

**Tabel 2.** Effect van 0, 210, 500 piek en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de RGR en de opbrengst van de spruiten van spinazie (cv. Estivato) berekend over een periode van 14 dagen. De pieken duurden elk 2 uur, in totaal werden 5 pieken binnen 24 uur gegeven (zie "Behandeling 6", pag. 11). Alle planten waren 21 dagen oud en werden 14 dagen begast. Weergegeven zijn de gemiddelden van 9 metingen, elk bevatte 3 spruiten ± SD. De groeisnelheden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6").

H <sub>2</sub> S	RGR	Opbrengst
[ppb]	[g/g/dag]	[g]
0	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>	8.17 ± 1.32 <sup>a</sup>
100	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.66 ± 1.32 <sup>b</sup>
500piek	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.10 ± 1.32 <sup>a</sup>
500	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.66 ± 1.32 <sup>b</sup>

Uit tabel 1 volgt, dat de RGR van de spinazie die met verschillende H<sub>2</sub>S-concentraties werden begast, alleen gedurende de eerste week verschillend was. De planten die continu werden blootgesteld aan 500 ppb hadden een lagere RGR ten opzicht van de rest van de planten. De kleinere RGR bij de 210 begassing was niet significant. De piekbelasting had geen effect op de RGR (!).

Wanneer echter de RGR over 14 in plaats van 7 dagen werd berekend (tabel 2), dan was die bij de 210 en 500 ppb continue begassing kleiner dan bij de 500 ppb piekbegassing en de controle planten. Dit was kennelijk het gevolg van effecten die in de eerste week van de begassingsperiode optraden, daar de RGR in tabel 2 (14 daagse periode) het gemiddelde was van de waarden die vermeld staan in tabel 1 (7 daagse periode). Waarschijnlijk kwam er ergens tussen de twee weken een einde aan de exponentiële groeifase. Het was dus in deze fase waarin de RGR's onderling verschillen vertoonden (tabel 1). In tabel 2 is tevens de absolute opbrengst weergegeven, daar de RGR in feite niet zo vreselijk veel zegt, omdat de planten zich als gevolg van de begassing, per behandeling in een verschillend groeistadium bevonden. Het bleek, dat als gevolg van de begas-

sing met 210 en 500 ppb H<sub>2</sub>S de opbrengst met ± 43 % afnam ten opzichte van de controle planten. De RGR daling van deze planten was 27 % ten opzichte van de controle planten. Dus begassing had wel degelijk effect op de groei van de planten. De invloed van de piekbelasting was minder groot (opbrengst daalde met 13 %, de RGR met 7 %) en niet significant.

Op grond van deze resultaten en de link van de groei met de NADH oxydatie capaciteit in de spruit (zie "Inleiding" pag. 6), werd de laatste (o.a.) bepaald in de nu volgende experimenten.

## **ad 2) Resultaten en Discussie van de experimenten waarin de in vitro NADH oxydatie capaciteit en de sulfhydrylgehalten werden bepaald**

In verband met de statistische verwerking van de gegevens met betrekking tot de NADH oxydatie capaciteit (ANOVA test gevolgd door Tukey-HSD methode), was het noodzakelijk op deze data een worteltransformatie toe te passen. Dit leidde bij het terugtransformeren (naar normale waarden) tot een gemiddelde waarde ± een asymmetrisch standaarddeviatie interval (zie de tabellen hieronder). Voor details zie "Bijlage 6".

### **Experiment 1**

De planten werden opgekweekt en vervolgens begast zoals beschreven staat onder "Behandeling 1" op pag. 11. Op drie verschillende tijdstippen werd het FW, de in vitro NADH oxydatie capaciteit (ox. cap.), het totale SH-gehalte, het GSH- en cys-gehalte bepaald zoals beschreven is op pag. 16-18. Het experiment duurde 3 weken. In tabel 3 staan de resultaten van de in vitro NADH oxydatie capaciteits bepalingen. Hieruit blijkt, dat de begassingsconcentratie een (niet significante) daling van de ox. cap. veroorzaakte. In de tijd veranderde er eveneens nauwelijks iets.

Uit tabel 4 volgt, dat begassing met 250 ppb al na ongeveer 2 dagen een significante stijging veroorzaakte van zowel het totale SH- als het GSH- en cys-gehalte. Waarschijnlijk is de grote spreiding in de cys-gehalten, nadat de planten 15 dagen begast waren, er de oorzaak van dat dit gehalte niet significant hoger lag dan dat in de controle planten. Het effect van de begassing met 250 ppb leek het maximum ergens tussen de 2 en 8 dagen dat begassing plaatshad te bereiken. De gehalten in de controle planten veranderden niet in de tijd.



Tabel 3. Effect van 0 en 250 ppb H<sub>2</sub>S op de in vitro NADH oxydatie capaciteit in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige metingen ± SD. Wanneer slechts 2 metingen werden verricht is alleen het gemiddelde weergegeven. De gemiddelden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een t-test (P < 0.05, zie "Bijlage 6"). De gegevens met betrekking tot het versgewicht van de planten zijn ook toegevoegd. Hiermee zijn echter geen verdere berekeningen verricht.

lft plnt	gas duur	H <sub>2</sub> S [ppb]	FW [g]	NADH oxydatie capaciteit [μmol g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]		
				gem-SD	gem.	gem+SD
[dagen]						
8	2	0	0.12 ± 0.00*	7.6	7.7	7.8
15	9	0	0.81 ± 0.31*	7.4	10.5 <sup>a</sup>	14.1
15	9	250	0.53 ± 0.21*	3.6	5.3 <sup>a</sup>	7.4
22	16	0	3.98 ± 0.22*	-	8.4	-
22	16	250	2.17 ± 0.34*	-	5.1	-

\*) Gemiddelde van 36 metingen, die elk 10 spruiten bevatte;

\*) gemiddelde van 36 enkelvoudige metingen.

De resultaten van de SH-, GSH- en cys-bepalingen staan in de tabel hieronder.

Tabel 4. Effect van 0 en 250 ppb H<sub>2</sub>S op het totale SH-, GSH- en cys-gehalte in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige metingen ± SD. Wanneer slechts 2 metingen werden verricht is alleen het gemiddelde weergegeven. De gehaltenes waarachter verschillende letters genoteerd staan, zijn significant verschillend in een t-test (P < 0. 01, zie "Bijlage 6").

lft plnt	gas duur	H <sub>2</sub> S	SH	GSH	cys
[dagen]		[ppb]	[μmol g FW <sup>-1</sup> ]		
9	2*	0	0.20 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>
9	2*	250	0.72 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.03 <sup>b</sup>
14	8	0	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>
14	8	250	1.26 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.11 <sup>b</sup>
21	15	0	0.30 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>a</sup>
21	15	250	1.29 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.34 <sup>a</sup>

\*) Begassingsduur was 44 uur.

Besloten werd het experiment te herhalen, waarbij tevens de effecten van 2 andere begassingsconcentraties nl 100 en 500 ppb H<sub>2</sub>S bepaald zouden worden. Dit om enig inzicht te krijgen met welke concentraties piekbelastingen uiteindelijk uitgevoerd zouden moeten worden.

## Experiment 2

De planten werden gekweekt en daaropvolgend begast zoals beschreven staat onder "Behandeling 2" op pag. 12. De begassingsperiode was 14 dagen. De bepaling van de in vitro NADH ox. cap., het SH-, GSH- en cys-gehalte hadden plaats zoals beschreven staat op pag. 16-18, na een verblijf van resp. 1, 2, 7 en 14 dagen in de begassingstonnen. De resultaten met betrekking op de NADH ox. cap. staan in tabel 5. Hieruit blijkt, dat 1 dag begassen geen effect teweegbracht op de in vitro NADH ox. cap. Dit veranderde naarmate het experiment vorderde. Na 2 weken begassing was te zien, dat het effect van 100 ppb te verwaarlozen was (nl. niet significant verschillend van de controle planten) en dat begassing met 250 en 500 ppb een daling van de NADH ox. cap. veroorzaakte. Waarschijnlijk lag dus tussen de 100 en 250 ppb een concentratie niveau (drempelwaarde) waarboven wel en waaronder de plant geen hinder ondervond. Het effect wat dan optrad was al na 2 dagen begassing maximaal.

Uit tabel 6 blijkt, dat als gevolg van de begassing het cys-gehalte veel meer toenam (bijna 14 keer na 14 dagen begassing) in vergelijking tot het GSH-gehalte (wat op dat moment 3 keer zo groot was in de met 500 ppb begaste planten ten opzicht van de controle planten). Dit was ook in overeenstemming met de literatuur (zie Inleiding, pag. 7). Het SH-gehalte in de spruiten nam direct toe als gevolg van de begassing en over de eerste 7 dagen begassing bekeken, leek het effect van 100 ppb verwaarloosbaar te zijn ten opzichte van de controle planten, terwijl begassing met 250 en 500 ppb het SH-gehalte significant deed toenemen. Na 14 dagen begassing was het patroon echter wat veranderd. Met toenemende begassingsconcentratie nam ook het SH- (en GSH- en cys-) gehalte toe.

In de tijd veranderde er niet zoveel. Het bleek, dat de effecten van de begassing over het algemeen al na 2 dagen begassing maximaal waren.

Tabel 5. Effect van begassing met 0, 100, 250 en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de in vitro NADH oxydatie capaciteit in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige metingen ± SD. Wanneer slechts 2 metingen werden verricht is alleen het gemiddelde weergegeven. De gemiddelden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6"). De gegevens met betrekking tot het versgewicht van de spruiten zijn ook toegevoegd. Hiermee zijn echter geen verdere berekeningen verricht.

lft plnt	gas duur	H <sub>2</sub> S [ppb]	FW [g]	NADH oxydatie capaciteit [μmol g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]		
				gem-SD	gem.	gem+SD
7	1	0	0.08 ± 0.02*	3.9	5.7 <sup>a</sup>	8.0
7	1	100	0.07 ± 0.01*	5.0	6.6 <sup>a</sup>	8.5
7	1	250	0.07 ± 0.00*	2.8	4.0 <sup>a</sup>	5.4
7	1	500	0.05 ± 0.01*	4.4	6.2 <sup>a</sup>	8.5
8	2	0	0.09 ± 0.01*	8.4	9.2 <sup>a</sup>	9.9
8	2	100	0.08 ± 0.01*	6.7	7.7 <sup>ac</sup>	8.9
8	2	250	0.07 ± 0.01*	4.0	4.8 <sup>b</sup>	5.8
8	2	500	0.07 ± 0.01*	4.6	5.5 <sup>bc</sup>	6.6
13	7	0	0.48 ± 0.08*	5.8	7.4 <sup>a</sup>	9.2
13	7	100	0.34 ± 0.09*	6.8	8.9 <sup>a</sup>	11.2
13	7	250	0.24 ± 0.06*	3.4	4.9 <sup>a</sup>	6.7
13	7	500	0.21 ± 0.07*	-	4.4 <sup>a</sup>	-
20	14	0	1.68 ± 0.40*	6.6	7.8 <sup>a</sup>	9.1
20	14	100	1.45 ± 0.39*	8.6	8.7 <sup>a</sup>	8.9
20	14	250	0.65 ± 0.38*	3.5	4.8 <sup>b</sup>	6.2
20	14	500	0.69 ± 0.11*	3.8	4.0 <sup>b</sup>	4.2

\*) Gemiddelde van 6 bepalingen, elk bevatte 7-8 spruiten;

\*) gemiddelde van 6 enkelvoudige bepalingen;

De resultaten van de SH-bepalingen zijn hieronder weergegeven. **Tabel 6.** Effect van begassing met 0, 100, 250 en 500 ppb H<sub>2</sub>S op het totale SH-, GSH- en cys-gehalte in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige metingen ± SD. Wanneer slechts 2 metingen werden verricht is alleen het gemiddelde weergegeven. De gehaltenes waarachter verschillende letters genoteerd staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6").

lft.	gas.	H <sub>2</sub> S	SH	GSH	cys
plnt	duur				
[dagen]		[ppb]	[μmol g FW <sup>-1</sup> ]		
7	1	0	0.27 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>a</sup>	-
7	1	100	0.70 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.06 <sup>a</sup>
7	1	250	0.93 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.05 <sup>a</sup>
7	1	500	0.97 ± 0.16 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.12 <sup>a</sup>
8	2	0	0.31 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.07 <sup>a</sup>
8	2	100	0.46 ± 0.40 <sup>a</sup>	-	-
8	2	250	1.15 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>b</sup>
8	2	500	1.24 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.19 <sup>b</sup>
13	7	0	0.42a	0.20	-
13	7	100	0.55 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.41	0.26
13	7	250	0.61 ± 0.37 <sup>a</sup>	-	-
13	7	500	1.26 ± 0.15 <sup>b</sup>	-	-
20	14	0	0.31 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>
20	14	100	0.85 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>b</sup>
20	14	250	1.32 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.66 ± 0.14 <sup>c</sup>
20	14	500	1.73 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.97 ± 0.10 <sup>d</sup>

Besloten werd het experiment te herhalen. Vanwege een tekort aan tonnen werd alleen begast met 0, 100 en 500 ppb H<sub>2</sub>S (de effecten als gevolg van 250 ppb H<sub>2</sub>S begassing waren toch vergelijkbaar met die veroorzaakt door 500 ppb H<sub>2</sub>S). In de begassingtonnen zou continu licht worden gegeven, zodat in latere experimenten de piekbelastingen homogeen over de dag verdeeld konden worden, waardoor het oogsten gewoon steeds 's ochtends kon plaats blijven hebben. Wanneer er wel een dag / nacht ritme aanwezig zou zijn, is dit oogsttijdstip een moeilijk punt, want zijn de effecten van piekbelastingen overdag gelijk aan die van 's nachts? Zo nee, wanneer moet er dan geoogst worden? Aangezien er in de literatuur niks bekend is over deze effecten is 24 uur licht per dag een handig uitgangspunt.

### Experiment 3

De planten werden opgekweekt en vervolgens begast zoals beschreven staat onder "Behandeling 3" op pag. 12 (continu licht). De totale begassingsduur was 3 dagen. Elke dag werden planten uit de tonnen verwijderd ten behoeve van de in vitro NADH ox. cap. en de SH-bepalingen. Deze vonden plaats op de manier die staat beschreven op pag. 16-18. De NADH-bepalingen verliepen vanaf dit moment zoals het hoorde (zie "In vitro NADH ox. cap." op pag. 17). In tabel 7 staan de resultaten hiervan weergegeven. Het blijkt, dat het effect van begassing met 100 ppb verwaarloosbaar was ten opzichte van de controle planten. Als gevolg van de begassing met 500 ppb H<sub>2</sub>S daalde de in vitro NADH ox. cap. significant. In de tijd bleek er weinig effect te zijn. Na 2 dagen begassing was de teweeggebrachte daling in de ox. cap. maximaal.

Uit tabel 8 blijkt, dat de GSH- en cys-gehalten ten gevolge van de begassingsconcentraties en -tijd 2-3 keer resp. 3-17 keer zo groot werden ten opzichte van de controle planten. Het SH-gehalte nam toe bij opklimmende begassingsconcentratie en had, net als het GSH- en cys-gehalte, al na 2 dagen een maximum niveau bereikt. Ook begassing met 100 ppb H<sub>2</sub>S veroorzaakte een significante stijging van het SH-gehalte. Dit is in tegenstelling met de resultaten van experiment 2, waar deze begassingsconcentratie veel minder duidelijk effect had teweeggebracht.

Tabel 7. Effect van begassing met 0, 100 en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de in vitro NADH oxydatie capaciteit in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige metingen ± SD. De gemiddelden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6") De gegevens met betrekking tot het versgewicht van de spruiten zijn ook toegevoegd. Hiermee zijn echter geen verdere berekeningen verricht.

lft plnt	gas duur	H <sub>2</sub> S [ppb]	FW [g]	NADH oxydatie capaciteit [μmol g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]		
				gem-SD	gem.	gem+SD
6	0	0	0.05 ± 0.00*	10.5	11.9	13.3
7	1	0	0.08 ± 0.01*	9.1	10.0 <sup>a</sup>	10.9
7	1	100	0.08 ± 0.00*	6.9	9.3 <sup>ab</sup>	12.2
7	1	500	0.07 ± 0.01*	6.1	6.2 <sup>b</sup>	6.4
8	2	0	0.12 ± 0.01*	4.6	7.1 <sup>a</sup>	10.1
8	2	100	0.11 ± 0.01*	7.7	10.0 <sup>a</sup>	12.7
8	2	500	0.08 ± 0.01*	4.2	4.9 <sup>a</sup>	5.6
9	3	0	0.19 ± 0.06*	11.1	12.5 <sup>a</sup>	13.9
9	3	100	0.17 ± 0.01*	12.9	14.0 <sup>a</sup>	15.0
9	3	500	0.11 ± 0.01*	1.9	3.3 <sup>b</sup>	5.0

\*) Gemiddelde van 6 bepalingen, elk bevatte 8-10 spruiten;

\*) gemiddelde van 6 enkelvoudige bepalingen, elk bevatte 5-8 spruiten.

Hieronder zijn de resultaten weergegeven van de SH-bepalingen.



Tabel 8. Effect van begassing met 0, 100 en 500 ppb H<sub>2</sub>S op het totale SH-, GSH- en cys-gehalte in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige bepalingen ± SD. De gehalten waarachter verschillende letters genoteerd staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6").

lft plnt	gas. duur	H <sub>2</sub> S	SH	GSH	cys
[dagen]		[ppb]	[μmol g FW <sup>-1</sup> ]		
6	0	0	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.04 ± 0.04
7	1	0	0.27 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>
7	1	100	0.56 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>
7	1	500	0.89 ± 0.13 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.36 ± 0.11 <sup>a</sup>
8	2	0	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>
8	2	100	0.57 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>a</sup>
8	2	500	0.79 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.13 <sup>b</sup>
9	3	0	0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
9	3	100	0.52 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup>
9	3	500	0.84 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>c</sup>

Besloten werd om in het volgende experiment piekbelastingen met 500 ppb H<sub>2</sub>S te geven, daar bij deze concentratie een (eventuele) veranderingen in de NADH ox. cap. en de sulfhydrylgehaltenes beter tot uiting zouden komen dan bij begassing met 100 ppb. Daar de hoeveelheid informatie die tot nu toe verkregen werd uit de bepalingen van de GSH- en cys-gehaltenes niet opwoog tegen de hoeveelheid werk die ervoor nodig was, werd de bepaling van deze gehaltenes in het vervolg achterwege gelaten. In feite zegt het totale SH-gehalte voldoende. Bovendien duurde de begassing slechts 2 dagen, daar uit bovenstaande experimenten wel bleek dat binnen deze periode de effecten een maximum bereikten.

#### Experiment 4

De planten werden gekweekt en daarop volgend begast zoals beschreven staat onder "Behandeling 4 en 5" op pag. 12-13. Er had slechts 2 dagen begassing plaats, zodat op 3 tijdstippen (nulpunt en op beide dagen) de in vitro NADH ox. cap. en het SH-gehalte werden bepaald, op de manier die staat beschreven op pag. 16-18. In tabel 9 staan de resultaten van de NADH ox. cap. bepalingen. Hieruit blijkt, dat de piekbelastingen die 2 uur duurden en de continue begassing met 500 ppb na 1 dag al een significante daling van de in vitro NADH ox. cap. veroorzaakten ten opzichte van dat in de controle planten. De begassing met 210 ppb continu week hier (nog) niet significant van af, zodat de effecten van de bijbehorende piekbelasting ernstiger leken. Na 2 dagen begassen waren er echter wel duidelijke effecten aanwezig. Er leek voor de begassingsconcentratie een soort drempelwaarde te bestaan die in lag tussen de effecten die werden veroorzaakt door begassing met 0, 100 ppb en 500 piek 1 en door 210 ppb, 500 piek 2 en 500 ppb. Deze twee groepen brachten min of meer dezelfde effecten teweeg. Dus het effect van 5 piekbelastingen per dag met elk een duur van 1 uur was gelijk aan welke veroorzaakt werd door 100 ppb H<sub>2</sub>S gedurende 24 uur per dag. Echter het effect van de piekbelasting die 2 uur duurde verschilde niet significant van die veroorzaakt door 100 ppb H<sub>2</sub>S en leek dus wat minder ernstige gevolgen te hebben dan de bijbehorende 210 ppb H<sub>2</sub>S-begassing. De effecten veranderden niet binnen de 2 dagen dat het experiment duurde.

Uit de resultaten in tabel 10 blijkt, dat de toename van het SH-gehalte na 1 dag begassing al maximaal was. De piekbelastingen die slechts 1 uur duurden en gevolgd werden door 3 <sup>3</sup>/<sub>4</sub> uur schone lucht (0 ppb) veroorzaakten een zelfde effect dan welke in de controle planten werden gevonden. De begassing met 100 ppb H<sub>2</sub>S had een groter SH gehalte tot gevolg. Ook de piekbelastingen die 2 uur per keer duurden hadden een lager SH-gehalte in de planten tot gevolg vergeleken met datgene wat de 210 ppb begassing veroorzaakte. De begassing met 500 ppb H<sub>2</sub>S veroorzaakte de grootste effecten. Dus in de volgorde 0, piek, bijbehorende continue concentratie, 500 ppb nam het SH gehalte toe en dus hadden de piekbelastingen minder effect in vergelijking tot de continue begassing!

Tabel 9. Effect van begassing met 0, 100, 500 ppb in 5 pieken per dag van 1 uur (piek1), 210, 500 ppb in 5 pieken per dag van 2 uur (piek2) en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de in vitro NADH oxydatie capaciteit in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). De gemiddelden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6"). De gegevens met betrekking tot het versgewicht van de spruiten zijn ook toegevoegd. Hiermee zijn echter geen verdere berekeningen verricht.

lft plnt	gas duur	H <sub>2</sub> S [ppb]	FW [g]	NADH oxydatie capaciteit [μmol g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]		
				gem-SD	gem.	gem+SD
[dagen]						
7	0	0	0.06 ± 0.02 <sup>*</sup>	9.1	10.8	12.6
8	1	0	0.10 ± 0.01 <sup>*</sup>	6.5	8.7 <sup>a</sup>	11.2
8	1	100	0.09 ± 0.00 <sup>*</sup>	6.6	7.4 <sup>ab</sup>	8.3
8	1	piek1	0.10 ± 0.01 <sup>*</sup>	4.3	6.3 <sup>ab</sup>	8.6
8	1	210	0.10 ± 0.01 <sup>*</sup>	4.2	6.0 <sup>ab</sup>	8.1
8	1	piek2	0.10 ± 0.01 <sup>*</sup>	3.8	4.8 <sup>b</sup>	6.0
8	1	500	0.09 ± 0.01 <sup>*</sup>	3.5	4.8 <sup>b</sup>	6.2
9	2	0	0.13 ± 0.02 <sup>*</sup>	5.7	7.2 <sup>a</sup>	8.9
9	2	100	0.15 ± 0.01 <sup>*</sup>	6.9	8.1 <sup>ac</sup>	9.4
9	2	piek1	0.12 ± 0.01 <sup>*</sup>	6.0	7.8 <sup>a</sup>	9.8
9	2	210	0.11 ± 0.01 <sup>*</sup>	2.9	3.5 <sup>b</sup>	4.1
9	2	piek2	0.12 ± 0.01 <sup>*</sup>	4.4	5.1 <sup>bc</sup>	5.7
9	2	500	0.11 ± 0.02 <sup>*</sup>	2.9	4.5 <sup>b</sup>	6.3

\* ) Gemiddelde van 12 bepalingen, elk bevatte 5 - 9 spruiten;

<sup>a</sup>) gemiddelde van 3 bepalingen, elk bevatte 5 - 9 spruiten;

<sup>b</sup>) gemiddelde van 6 bepalingen, elk bevatte 5 - 9 spruiten;

<sup>c</sup>) gemiddelde van 7 bepalingen, elk bevatte 7 - 9 spruiten.

De resultaten van de SH-bepalingen staan in de tabel hieronder weergegeven.

**Tabel 10.** Effect van begassing met 0, 100, 500 ppb in 5 pieken per dag van 1 uur (piek 1), 210, 500 ppb in 5 pieken per dag van 2 uur (piek 2) en 500 ppb H<sub>2</sub>S op het SH-gehalte in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). De gehaltenes waarachter verschillende letters genoteerd staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6").

leeft. plant [dagen]	begas. duur [dagen]	H <sub>2</sub> S [ppb]	SH [μmol g FW <sup>-1</sup> ]
7	0	0	0.27 ± 0.0 <sup>#</sup>
8	1	0	0.23 ± 0.04 <sup>a *</sup>
8	1	100	0.56 ± 0.02 <sup>bca</sup>
8	1	piek1	0.30 ± 0.06 <sup>a *</sup>
8	1	210	0.60 ± 0.01 <sup>b *</sup>
8	1	piek2	0.47 ± 0.04 <sup>dca</sup>
8	1	500	0.72 ± 0.07 <sup>e *</sup>
9	2	0	0.24 ± 0.04 <sup>a *</sup>
9	2	100	0.57 ± 0.04 <sup>bca</sup>
9	2	piek1	0.31 ± 0.01 <sup>a *</sup>
9	2	210	0.70 ± 0.03 <sup>bca</sup>
9	2	piek2	0.53 ± 0.05 <sup>dca</sup>
9	2	500	0.87 ± 0.12 <sup>e *</sup>

- #) Gemiddelde van 15 bepalingen, elk bevatte 7-10 spruiten;
- \*) gemiddelde van 12 bepalingen, elk bevatte 6-10 spruiten;
- \*) gemiddelde van 3 bepalingen, elk bevatte 8-10 spruiten;
- \*) gemiddelde van 6 bepalingen, elk bevatte 6-10 spruiten.

Echter in dit experiment was het licht in de tonnen nog steeds 24 uur per dag aan wat natuurlijk niet strookt met de situatie in het veld. Als laatste experiment werd daarom opnieuw een dag / nacht ritme ingesteld en met 2 uur durende 500 ppb H<sub>2</sub>S pieken begast. Dit omdat de 1 uurspieken zowel wat de in vitro NADH ox. cap. als het SH-gehalte betreft geen effect veroorzaakten wat significant van de controle planten verschilde.

#### Experiment 5

De spinazie werd gekweekt en vervolgens begast zoals beschreven staat onder "Behandeling 6" op pag. 13. Er had slechts 2 dagen begassing plaats. De in vitro NADH ox. cap. en het SH-gehalte in de spruit werden op 3 tijdstippen bepaald op de manier die staat beschreven op pag. 16-18. Tevens werden enkele metingen verricht met betrekking tot de geleiding van de spruit voor H<sub>2</sub>O (q(H<sub>2</sub>O)) en de daarvan afgeleide geleiding voor H<sub>2</sub>S. Echter de verschillende behandelingen bleken hierop geen effecten te veroorzaken. Wel was de spreiding in de data erg groot, wat mede een oorzaak was van het afwezig zijn van significant verschillen. Voor details met betrekking tot de berekeningen van de q(H<sub>2</sub>O) en q(H<sub>2</sub>S) zie "Bijlage 4". Dat de H<sub>2</sub>S-begassing de stomataire geleidbaarheid niet beïnvloedde was in overeenstemming met de literatuur (zie "Inleiding" pag. 6-7).

Uit de resultaten van de NADH ox. cap. (tabel 11) blijkt, dat de daling hiervan voornamelijk op de tweede begassingsdag optrad. De daling als gevolg van de piekbelasting is gelijk aan die veroorzaakt door de begassing met 210 ppb H<sub>2</sub>S. De hoogste begassingsconcentratie had het grootste effect. Dit is in overeenstemming met wat in experiment 4 gevonden werd. Maar kennelijk was als gevolg van het dag / nacht ritme de NADH ox. cap. van de 210 ppb en 500 piek belasting niet meer significant verschillend van dat in de controle planten.

Uit de tabel 12 volgt, dat de SH-gehaltenes van de met pieken belaste planten lager waren dan die van de planten die met 210 ppb H<sub>2</sub>S werden begast. De hoogste gehaltenes werden gevonden in de met 500 ppb H<sub>2</sub>S begaste planten. Dus ook nu gold, dat in de volgorde 0, piek, continu 210, 500 ppb de effecten groter waren, wat in overeenstemming was met de uitkomsten van experiment 4 (pag. 30-32). Tevens bleken de SH-gehaltenes van de begaste planten op de tweede dag hoger te liggen dan op de eerste dag.

Tabel 11. Effect van begassing met 0, 210, 500 ppb in 5 pieken per dag van 2 uur (piek2) en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de in vitro NADH oxydatie capaciteit in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). De gemiddelden waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6"). De gegevens met betrekking tot het versgewicht van de spruiten zijn ook toegevoegd. Hiermee zijn echter geen verdere berekeningen verricht.

lft plnt	gas duur	H <sub>2</sub> S	FW	NADH oxydatie capaciteit		
				[μmol g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]		
[dagen]		[ppb]	[g]	gem-SD	gem.	gem+SD
7	0	0	0.06 ± 0.02 <sup>*</sup>	9.1	10.8	12.7
8	1	0	0.05 ± 0.01 <sup>*</sup>	5.9	6.5 <sup>a</sup>	7.1
8	1	210	0.05 ± 0.01 <sup>*</sup>	3.9	5.3 <sup>a</sup>	6.9
8	1	piek2	0.06 ± 0.01 <sup>*</sup>	6.1	8.1 <sup>a</sup>	10.5
8	1	500	0.04 ± 0.01 <sup>*</sup>	4.5	5.7 <sup>a</sup>	7.0
9	2	0	0.06 ± 0.01 <sup>*</sup>	5.6	7.4 <sup>a</sup>	9.4
9	2	210	0.06 ± 0.01 <sup>*</sup>	4.4	4.6 <sup>ab</sup>	4.9
9	2	piek2	0.06 ± 0.01 <sup>*</sup>	4.6	6.3 <sup>a</sup>	8.3
9	2	500	0.06 ± 0.01 <sup>*</sup>	1.7	2.5 <sup>b</sup>	3.5

- \* ) Gemiddelde van 12 bepalingen, elk bevatte 5-9 spruiten;  
 ° ) gemiddelde van 3 bepalingen, elk bevatte 5-9 spruiten;  
 ' ) gemiddelde van 6 bepalingen, elk bevatte 5-9 spruiten;

De resultaten van de SH-bepalingen zijn hieronder weergegeven.

**Tabel 12.** Effect van begassing met 0, 210, 500 ppb in 5 pieken per dag van 2 uur (piek 2) en 500 ppb H<sub>2</sub>S op het SH-gehalte in de spruiten van spinazie (cv. Estivato). De gehaltenes waarachter verschillende letters genoteerde staan zijn significant verschillend in een ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6").

leeft. plant [dagen]	begas. duur [dagen]	H <sub>2</sub> S [ppb]	SH [μmol g FW <sup>-1</sup> ]
7	0	0	0.27 ± 0.04 #
8	1	0	0.32 ± 0.05 <sup>a</sup> *
8	1	210	0.63 ± 0.02 <sup>b</sup> *
8	1	piek2	0.58 ± 0.04 <sup>b</sup> *
8	1	500	0.84 ± 0.05 <sup>c</sup> *
9	1	0	0.30 ± 0.05 <sup>a</sup> *
9		210	0.83 ± 0.03 <sup>b</sup> *
9	2	piek2	0.68 ± 0.04 <sup>c</sup> *
9	2	500	0.99 ± 0.11 <sup>d</sup> *

- #) Gemiddelde van 15 bepalingen, elk bevatte 7-10 spruiten;
- \*) gemiddelde van 12 bepalingen, elk bevatte 6-8 spruiten;
- \*) gemiddelde van 3 bepalingen, elk bevatte 7 spruiten;
- \*) gemiddelde van 6 bepalingen, elk bevatte 6-9 spruiten;
- \*) gemiddelde van 9 bepalingen, elk bevatte 6-9 spruiten.



## Eindconclusie m.b.t. de piekbegassingsexperimenten:

1) Daling van de in vitro NADH ox. cap. als gevolg van de piekbelasting was gelijk aan die veroorzaakt door bijbehorende continue belasting. Wanneer de resultaten van de groeiproef in dit kader worden beschouwd moet geconcludeerd worden, dat van de daling van de in vitro NADH oxydatie capaciteit hierin niets te merken is, wanneer de RGR over een periode van 1 week werd bepaald. Want de RGR van de controle planten verschilde niet significant met die in de planten die begast werden met 210 of 500 piek (2 uur) (zie pag. 13). Wanneer de RGR over een periode van 14 dagen werd bepaald bleek (tabel 13), dat de daling van de NADH ox. cap. geen gelijke tred hield met die van de RGR. De NADH ox. cap. werd sterker geremd bij de begassing met 210 ppb H<sub>2</sub>S en piekbelastingen van 2 uur met 500 ppb H<sub>2</sub>S. Bij begassing met 500 ppb continu was deze remming 2 keer zo sterk in vergelijking tot de remming van de RGR. Maar de RGR van de planten die met pieken werden belast bleef gelijk aan die van de controle planten. Het verschil in remming was waarschijnlijk voornamelijk het gevolg van het feit, dat de planten die werden gebruikt om de RGR te bepalen 2 weken oud waren. Dit in tegenstelling tot de planten waarvan het NADH ox. cap. werd bepaald. Deze planten waren slechts 9 dagen oud en bevonden zich dus in een ander ontwikkelingsstadium dan de 21 dagen oude planten. Immers, uit tabel 1 bleek, dat tussen de eerste en tweede week van begassing waarschijnlijk de exponentiële groeifase ten einde kwam.

Tabel 13. Vergelijking van de RGR met de NADH oxydatie capaciteit bij begassing met 0, 210, 500 ppb in 5 pieken per dag van 2 uur en 500 ppb H<sub>2</sub>S. Alle gemiddelde waarden zijn uitgedrukt als % van de controle planten. De percentages waarachter verschillende letters staan zijn significant verschillend in ANOVA test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode, zie "Bijlage 6"). De data uit tabel 2 en 12 (na 2 dagen begassing, de planten waren 9 dagen oud) zijn hier gecombineerd.

H <sub>2</sub> S [ppb]	RGR % van controle	NADH ox. cap. % van controle
0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
210	73 <sup>b</sup>	62 <sup>ab</sup>
piek2	93 <sup>a</sup>	85 <sup>a</sup>
500	73 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>

2) Stijging van het SH-gehalte in de spruit als gevolg van de piekbelasting was minder dan die het gevolg was van de bijbehorende continue belasting.

Beide effecten 1) en 2) waren goed waarneembaar nadat 2 dagen begassing had plaatsgehad.

Er zal nader onderzoek moeten plaatsvinden naar de effecten van de piekbelastingen. Maar op grond van bovenvermelde experimenten kan worden geconcludeerd, dat de effecten met betrekking tot de NADH ox. cap. en het SH-gehalte in de spruit die de pieken veroorzaken even resp. minder ernstig zijn dan welke werden veroorzaakt door bijbehorende continue begassingsconcentratie. Kennelijk was het niet zo, dat wanneer dosis \* tijd constant bleef, de effecten hetzelfde waren. De tijd van de blootstelling leek belangrijker te zijn dan de concentratie. Echter er zal nader onderzoek naar de effecten

van piekbelastingen plaats moeten hebben, immers wat zijn de gevolgen van pieken van veel hogere concentraties? En wat is het effect wanneer er meer luchtverontreinigingscomponenten tegelijkertijd in de atmosfeer aanwezig zijn? Deze en nog vele andere vragen zullen beantwoord moeten worden voordat de conclusie met betrekking tot het wel of niet moeten aanpassen van de huidige luchtkwaliteitsnormering zoals die in Nederland geldt hard kan worden gemaakt.

## LITERATUUR

1. Afdeling Biologie. Faculteit Wiskunde- en Natuurwetenschappen. Rijksuniversiteit Groningen. 1991. Onderzoeksprojecten milieubiologie. Interne projecten van de Afdeling Biologie die passen in de subfase 3 van de hoofdrichting Milieubiologie. 20.
2. Akkerman, T. 1988. Effect van zwavelwaterstof op de vegetatie. Biologiewinkelrapport 24. Rijksuniversiteit Groningen. 18-20.
3. Biersteker, K., Van Ham, J. & Wijbenga, A. 1986. Normstelling voor luchtverontreiniging. Proceedings van het symposium. Amersfoort 1985. 3-13, 30-44, 49-50, 60-67, 72-85.
4. Bosma, W., Kamminga, G. & De Kok, L.J. 1990. H<sub>2</sub>S-induced accumulation of sulfhydrylcompounds in leaves of plants under field and laboratory exposure. Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants, edited by H. Rennenberg et al. 173-175.
5. Bosma, W., Butter, M.E. & De Kok, L.J. 1991. Plantenschade door zwavelwaterstof. Een onderzoek met behulp van biomonitoring experimenten in Oost Groningen naar de bruikbaarheid van fysiologische schadeparameters in het veld. Biologiewinkelrapport 30. Rijksuniversiteit Groningen. 11-19, 31-39.
6. Buwalda, F., De Kok, L.J., Stulen, I. & Kuiper, P.J.C. 1988. Cysteïne,  $\gamma$ -glutamyl-cysteïne and glutathione contents of spinach leaves as effected by darkness and application of excess sulfur. *Physiologia Plantarum* 74: 663-668.
7. Buwalda, F., Stulen, I., De Kok, L.J. & Kuiper, P.J.C. 1990. Cysteïne,  $\gamma$ -glutamyl-cysteïne and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H<sub>2</sub>S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole. *Physiologia Plantarum* 80: 196-204.
8. De Kok, L.J., Bosma, W., Maas, F.M. & Kuiper, P.J.C. 1985. The effect of short-term H<sub>2</sub>S fumigation on water-soluble sulfhydryl and glutathione levels in spinach. *Plant, Cell and Environment* 8: 189-194.

- 8<sup>a</sup>. De Kok, L.J., Stulen, I., Bosma, W. & Hibma, J. 1986. The effect of short-term H<sub>2</sub>S fumigation on nitrate reductase activity in Spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 27 (7): 1249-1254.
9. De Kok, L.J., Buwalda, F. & Bosma, W. 1988. Determination of cysteine and its accumulation in spinach leaf tissue upon exposure to excess sulfur. *J. Plant Physiol.* Vol. 133: 502-505.
10. De Kok, L.J. 1988. Responses of sulfur metabolism in plants to atmospheric hydrogen sulfide. *Phyton (Austria)* 29 (2): 189-201. 17-11-1989.
11. De Kok, L.J., Stahl, K. & Rennenberg, H. 1989. Fluxes of atmospheric hydrogen sulphide to plant shoots. *New Phytol.* 112: 533-542.
12. De Kok, L.J. 1990. Effects of atmospheric hydrogen sulfide on plant metabolism. *Wechselwirkungen Pflanzen-Pathogene.* H. Guttenberger, E. Bermadinger, D. Grill.
13. De Kok, L.J. 1990. Sulfur metabolism in plants exposed to atmospheric sulfur. *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, edited by H. Rennenberg et al. 111-130.
14. De Kok, L.J., Rennenberg, H. & Kuiper, P.J.C. 1991. The internal resistance in spinach leaves to atmospheric H<sub>2</sub>S deposition is determined by metabolic processes. *Plant Physiol. Biochem.* 29 (5): 1-
15. Handleiding vaste proeven 29 oktober - 22 december 1990. *Cursus Milieu-effecten in planten. Moleculaire en fysiologische achtergrond.* Lab. voor Plantenfysiologie. Rijksuniversiteit Groningen.
16. Maas, F.M., De Kok, L.J. & Kuiper, P.J.C. 1985. The effect of H<sub>2</sub>S fumigation on various spinach (*spinacia oleracea* L.) cultivars. Relation between growth inhibition and accumulation of sulphur compounds in the plant. In Responses of plants to sulfur containing air pollutants (H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub>): 17-25.
17. Maas, F.M., De Kok, L.J., Peters, J.L. & Kuiper, P.J.C. 1987. A comparative study on the effects of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> fumigation on the growth and accumulation of sulphate and sulphy-

dryl compounds in *Trifolium pratense* L., *Glycine max* Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 38. No. 194: 1459-1469.

18. Maas, F.M., De Kok, L.J., Hoffmann, I. & Kuiper, P.J.C. 1987. Plant responses to H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> fumigation. I. Effects on growth, transpiration, and sulfur content of spinach. *Physiologia Plantarum* 70: 713-721.

19. Maas, F.M. & De Kok, L.J. 1988. In vitro NADH oxidation as an early indicator for growth reduction in spinach exposed to H<sub>2</sub>S in the ambient air. *Plant Cell Physiol.* 29 (3): 523-526.

20. Milieukwaliteitsdoelstellingen bodem en water. College-dictaat subfase 2 cursus Ecotoxicologie. 1991. Rijksuniversiteit Groningen.

21. Ministerie van VROM. 1990. Milieuprogramma 1991-1994. Deel III. Begrippenkader van het milieubeleid. Tweede Kamer, vergaderjaar 1990-1991, 21 802, nrs. 1-2.

22. Ministerie van VROM. 1983. Geurnormering. Publicatiereeks Lucht 11.

23. Ministerie van VROM. 1983. Indicatief Meerjaren Programma Lucht 1984-1988. Tweede Kamer, vergaderjaar 1983-1984, 18 100 hoofdstuk XI, nr. 7. 6-7, 26-27, 63-67, 80,81, 104,108.

24. Ministerie van VROM. 1984. Indicatief Meerjaren Programma Lucht 1985-1989. Tweede Kamer, vergaderjaar 1984-1985, 18 605, nrs. 1-2. 14-16, 39-48, 73-76.

25. Ministerie van VROM. 1985. Beoordeling cumulatie stankhinder door intensieve veehouderij. Publicatiereeks Lucht 46. 4-10.

26. Ministerie van VROM. 1985. Indicatief Meerjaren Programma Milieubeheer 1986-1990. Tweede Kamer, vergaderjaar 1985-1986, 19 204, nrs. 1-2. 71-73, 153-155.

27. Ministerie van VROM. 1985. Indicatief Meerjaren Programma Milieubeheer 1986-1990. Vortgangsrapportage. Tweede Kamer, vergaderjaar 1985-1986, 19 204, nr.3. 30.

28. Ministerie van VROM. 1985. Standaardisatie olfactometers.

Publicatiereeks Lucht 49. 4-5.

29. Ministerie van VROM. 1986. Indicatief Meerjaren Programma Milieubeheer 1987-1991. Tweede Kamer, vergaderjaar 1986-1987, 19 707, nrs. 1-2. 31-36, 46-57.

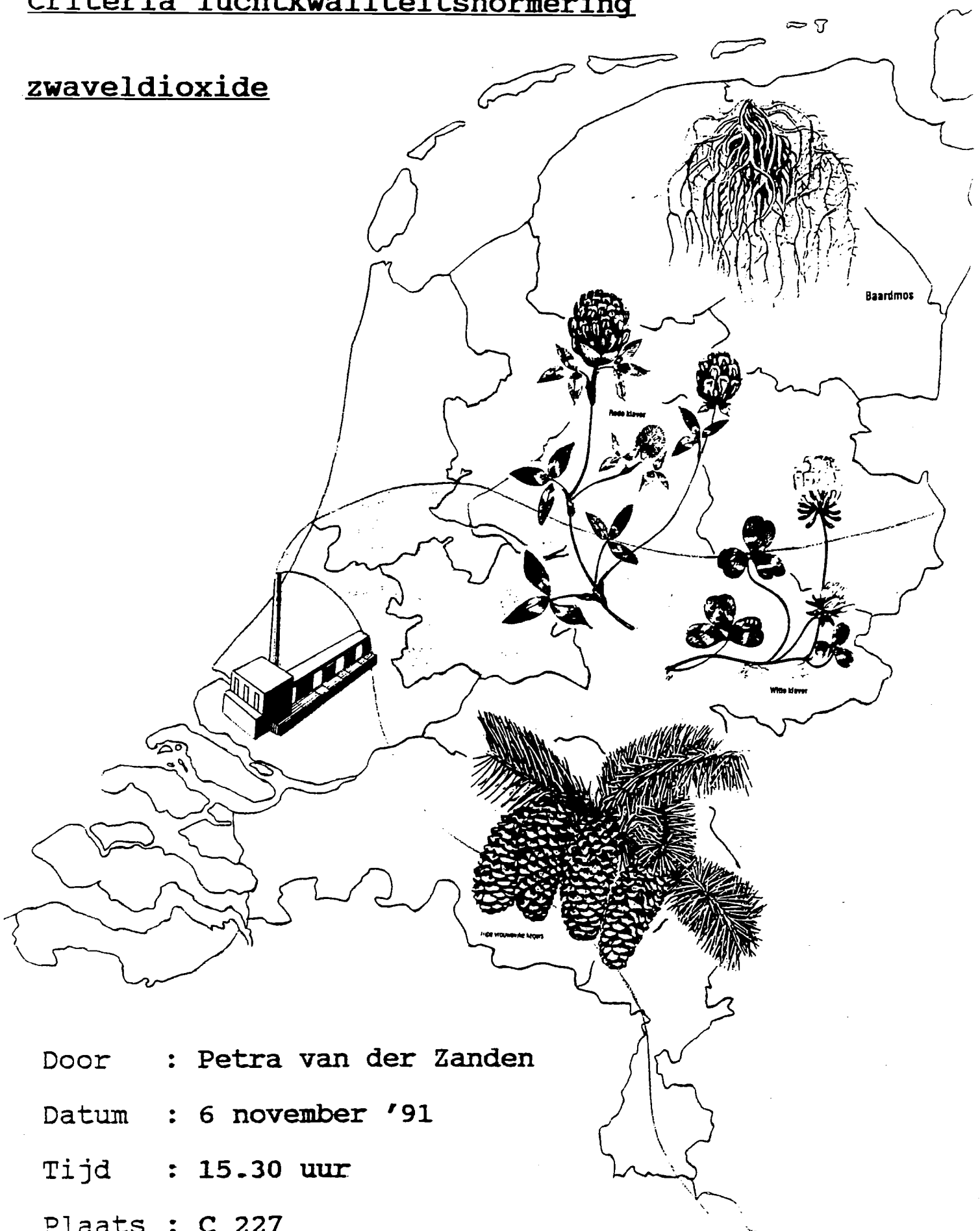
30. Ministerie van VROM. 1986. Stankbeleving in de woonomgeving. Publicatiereeks Lucht 50. III-VIII.

31. Rennenberg, H. 1984. The fate of excess sulfur in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:121-153.

32. Weissing, F. Collegedictaat Subfase 3 cursus "Data-analyse en toegepaste statistiek". April 1992. Rijksuniversiteit Groningen.

Criteria luchtkwaliteitsnormering

zwaveldioxide



Door : Petra van der Zanden

Datum : 6 november '91

Tijd : 15.30 uur

Plaats : C 227



### Inleiding

In Nederland komen jaarlijks honderdduizenden tonnen zwaveldioxide (SO<sub>2</sub>) in de atmosfeer a.g.v. emissies uit natuurlijke en antropogene bronnen (14, 21, 26). SO<sub>2</sub> is reeds bij lage concentraties toxisch voor mensen, dieren en planten (3, 6, 12). Om mens en milieu hiertegen te beschermen is er sinds 1986 een AMvB van kracht waarin luchtkwaliteitsnormen voor SO<sub>2</sub> zijn vastgelegd (17).

De vraagstelling van dit colloquium is:

Welke nationale en internationale aspecten hebben een rol gespeeld bij de totstandkoming van deze luchtkwaliteitsnorm?

### Nationale- en internationale aspecten

I.v.m. de grensoverschrijdende luchtverontreiniging is het van belang dat terugdringing van de SO<sub>2</sub>-emissie in Europees verband plaatsheeft, wil zo'n AMvB die in Nederland opgesteld is ook echt kunnen leiden tot verbetering van de luchtkwaliteit boven Nederland (1, 16, 17). Hiertoe heeft de Raad van de Europese Gemeenschappen o.a. op 15 juli 1980 een richtlijn vastgesteld betreffende grens- en richtwaarden van de luchtkwaliteit voor SO<sub>2</sub> (5, 17). Dit leidde voor Nederland ondermeer tot het opstellen van interimgrens- en richtwaarden in IMP's - L en IMP's - M (vanaf '81) (18, 19, 21, 22) waarnaar in 1986 wettelijke vastlegging van de waarden plaatsvond (17). Vanaf die tijd kan er gesproken worden over een luchtkwaliteitsnorm voor SO<sub>2</sub> die samengesteld is uit grens- en richtwaarden (1, 20). Wettelijke grenswaarden beogen de gezondheid van de mens te beschermen. Overschrijding van deze waarden is niet toegestaan. Wettelijke richtwaarden dienen met name ter bescherming van het milieu. Met deze waarden moet rekening worden gehouden wat betekent, dat overschrijding is toegestaan (17, 24, 25).

### Hoogte grens- en richtwaarden SO<sub>2</sub>

De grens- en richtwaarden worden uitgedrukt in P-percentielwaarden. Dit houdt in dat de norm op  $(100 - P) * 365$  dagen van het jaar geen betrekking heeft (2, 24, 26). Op deze manier wordt rekening gehouden met het feit, dat de milieukwaliteit afhankelijk is van meteorologische omstandigheden (9, 10).

Tabel 1. Luchtkwaliteitsnormen in Nederland. De percentielwaarden zijn vastgesteld op basis van meetgegevens van 24-uursgemiddelde concentraties over de periode van één jaar (17).

Parameter	Richtwaarden		Grenswaarden	
	[ $\mu\text{gm}^3$ ]	[ppb]	[ $\mu\text{gm}^3$ ]	[ppb]
50-percentiel	30	11	75	26
95-percentiel	80	28	200	70
98-percentiel	100	35	250	88
24-uursgemiddelde	-	-	500	175
uurgemiddelde	-	-	830	291

### Achtergronden richtwaarden

De 50-percentiel richtwaarde is gebaseerd op gegevens van Posthumus (11, 17) die op basis van laboratoriumexperimenten en gegevens uit de internationale literatuur een belasting-effectrelatie voor SO<sub>2</sub> op planten heeft opgesteld (1). Ook een resolutie van de IUFRO, waarin de productie van naaldbossen wordt vergeleken met de in de lucht aanwezige SO<sub>2</sub>-concentratie, vormt een basis voor deze percentielwaarde (8). De 98-percentiel richtwaarde komt voort uit onderzoek aan epifytische korstmossen in Engeland en Wales uitgevoerd door Hawksworth & Rose (7) en uit onderzoek in Nederland wat is uitgevoerd door het WHEN-project (27). Maar waarop is het 95-percentiel richtwaarde gebaseerd en waarom is deze waarde vanaf IMP-L 1985-1989 geïntroduceerd (21)? Uit bovenstaande lijken de 50- en 98-percentielwaarden goed onderbouwd te zijn met wetenschappelijke gegevens. Of is het schijn die hier bedriegt?

### Metten SO<sub>2</sub>-concentraties

Nederland is op grond van Art. 6 en Art. 10 van de EG-richtlijn verplicht een meetnet op te richten over heel Nederland (4, 13) en hierop metingen te verrichten die aan bepaalde (nauwkeurigheds)voorwaarden voldoen (5). Op nationaal niveau zijn via de AMvB voor SO<sub>2</sub> en het Meetbesluit SO<sub>2</sub> aanvullende eisen m.b.t. meetnauwkeurigheid en de te gebruiken meetmethoden (4, 23) gesteld.

### Trend (huidige) luchtkwaliteit

Sinds het einde van de jaren 70 is de emissie van SO<sub>2</sub> sterk gedaald. Dit blijkt ook uit P 50- en P 98-waarden die bepaald zijn in de jaren '77 - '89 (14, 16, 26).

### Conclusies

In '89 is de jaargemiddelde SO<sub>2</sub>-concentratie 10 µgm<sup>-3</sup> (4 ppb) wat in het rapport "Zorgen voor morgen" als beschermingsniveau voor wilde planten wordt aangehouden (14, 15). Maar ondanks die lage jaargemiddelde concentratie zijn in '89 op verschillende plaatsen in Nederland de richtwaarden overschreden (14) op meer dagen dan volgens de P-percentielwaarden is toegestaan. De norm biedt dus ruimte voor het (regelmatig) optreden van piekbelastingen met als gevolg? Toch kan in '93 de geplande aanscherping van de richtwaarden plaatsvinden, daar de gemiddelde luchtkwaliteit al beter is dan de nu geldende richtwaarden (14). Bedenk echter wel, dat bovenstaand verhaal alleen geldt voor de droge depositie van SO<sub>2</sub>. Hoe het zit met de gevolgen van natte depositie of met de synergistische effecten van een cocktail van luchtverontreinigingscomponenten valt buiten het kader van dit colloquium.

De toekomst van het verloop van de SO<sub>2</sub>-concentratie in de lucht is onzeker i.v.m. de niet onuitputtelijke voorraad aardgas (met laag S-gehalte, die de voornaamste reden is van de lage emissies) en het niet met zekerheid vast te stellen verloop van de energie-consumptie. Normering zorgt er echter voor, dat de SO<sub>2</sub>-concentratie die in de lucht aanwezig is aan banden wordt gelegd.

## Literatuur

1. Biersteker, K., Van Ham, J. & Wijbenga, A. 1986. Normstelling voor luchtverontreiniging. Proceedings van het symposium. Amersfoort 1985. 3-13, 30-44, 49-50, 60-67, 72-85.
2. Bosma, W., Butter, M.E. & De Kok, L.J. 1991. Plantenschade door zwavelwaterstof. Een onderzoek m.b.v. biomonitoring experimenten in Oost Groningen naar de bruikbaarheid van fysiologische schadeparameters in het veld. Biologiewinkelrapport 30, Rijksuniversiteit Groningen, Haren. 5-7.
3. Chemiekaarten. Vierde editie, 1988. 915, 931-932.
4. Van Egmond, N.D. et al. 1986. Technische aspecten van het besluit luchtkwaliteit zwaveldioxide en zwevende deeltjes (zwarte rook).
5. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen. 1980. Richtlijn van de raad van 15 juli 1980 betreffende grenswaarden en richtwaarden van de luchtkwaliteit voor zwaveldioxide en zwevende deeltjes. Nr. L229 (80-779-EEG).
6. Freer-Smith, P.H. 1985. The influence of SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> on the growth, development and gas exchange of *Betula Pendula roth.* New Phytol. 1985. Vol. 99/3.
7. Hawksworth, D.L. & Rose, F. 1970. Qualitive scale for estimating SO<sub>2</sub> air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. Nature 227: 145-148.
8. International Union of Forest Research Organisations (IUFRO) News supplement to no. 25. Subject group S 2.09-00 Air pollution. 1978. Resolution on air quality standards for the protection of forests.
9. Lelieveld, J. & Helas, G. 1987. Luchtverontreiniging in de troposfeer. 13-17, 101-108.
10. Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut (KNMI). 1979. Luchtverontreiniging en weer. 22-31, 100-106, 117-158.
11. Posthumus, A.C. 1980. Effecten SO<sub>2</sub> op planten en ecosystemen. Proceedings van het SO<sub>2</sub>-symposium te Wageningen. 61-67.
12. Reinert, R.A. & Gray, T.N. 1980. The response of Radish to nitrogen dioxide, sulfur dioxide and ozone, alone and in combination. J. Environ. Qual., Vol. 10/2: 240-243. 1981.
13. Publicatie Raad voor het Milieu- en Natuuronderzoek (RMNO). 1985. Milieumeetnetten inventarisatie, analyse, perspectief. no. 14. 1-47.

14. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM). 1990. Luchtkwaliteit Jaarverslag 1989. vi-ix, 39-53, 157-185.
15. Samson, H.D. & Willink, T. 1990. Zorgen voor morgen. Nationale milieuverkenning 1985-2010. 102-113.
16. Ministerie van Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer (VROM). 1984. Advies over SO<sub>2</sub>. Publicatierreeks lucht 26. 1-34.
17. Ministerie van VROM. 1986. Besluit van 13 februari 1986, houdende regels als bedoeld in artikel 2 van de Wet inzake de luchtverontreiniging (Besluit luchtkwaliteit zwaveldioxide en zwevende deeltjes (zwarte rook)). Staatsblad 1986, 78.
18. Ministerie van VROM. 1982. Indicatief Meerjaren Programma Lucht 1981-1985. Tweede Kamer, zitting 1982-1983, 17 600 hoofdstuk XVII, nr. 7. 75-81.
19. Ministerie van VROM. 1983. Indicatief Meerjaren Programma Lucht 1984-1988. Tweede Kamer, vergaderjaar 1983-1984, 18 100 hoofdstuk XI, nr. 7, 59-63.
20. Ministerie van VROM. 1983. Samenvatting Indicatief Meerjaren Programma Lucht 1984-1988. 1-6.
21. Ministerie van VROM. 1984. Indicatief Meerjaren Programma Lucht 1985-1989. Tweede Kamer, vergaderjaar 1984-1985, 18 605, nrs. 1-2. 1-17.
22. Ministerie van VROM. 1985. Indicatief Meerjaren Programma Milieubeheer 1986-1990. Voortgangsrapportage. Tweede Kamer, vergaderjaar 1985-1986, 19 204, nr. 3. 1-8.
23. Ministerie van VROM. 1986. Meetbesluit zwaveldioxide en zwevende deeltjes. 7 februari 1986. C-3.b.
24. Ministerie van VROM. 1990. Milieuprogramma 1991-1994. Deel III. Begrippenkader van het milieubeleid. Tweede Kamer, vergaderjaar 1990-1991, 21 802, nrs. 1-2.
25. Ministerie van VROM. 1991. Notitie milieukwaliteitsdoelstellingen bodem en water. Tweede Kamer, vergaderjaar 1990-1991, 21 990, nr. 1.
26. Ministerie van VROM. 1979. SO<sub>2</sub>-beleidsplan. Kamerstukken II, 1979-1980, 15 834, nrs. 1-2. 11-26, 37-69, 103.
27. De Wit, T. 1976. Epiphytic lichens and air pollution in the Netherlands.

Bijlage 2. Samenstelling  $\frac{1}{4}$  Hoagland voedingsoplossing.

Per 10 liter oplossing:

A, B, C, D	25	ml
Micro nutriënten	2.5	ml
Ferro rexenol (5 ppm Fe)	0.25	ml

A = $\text{KNO}_3$	506	g
B = $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1180	g
C = $\text{KH}_2\text{PO}_4$	136	g
D = $\text{MgSO}_4$	492	g

Micro nutriënten :

$\text{H}_3\text{BO}_3$	28.6	g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18.1	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2	g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.8	g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26	g

**Bijlage 3.** Voorbeeld van de berekening van de Relative Growth Rate (RGR) met behulp van de gegevens van de controle planten, die 14 dagen oud zijn en 7 dagen in de tonnen hadden gestaan (zie pag. 16-17).

Zoals ook vermeld staat op pag. 12 is de RGR te definiëren als:

$$RGR = \frac{\ln(\text{eindgewicht}) - \ln(\text{begingewicht})}{(t_2 - t_1)} \quad [g^{-1}g^{-1}dag^{-1}]$$

In onderstaande tabel staan alle gegevens die nodig zijn voor deze berekening vermeld.

Tabel 14. Overzicht van de gegevens die nodig zijn bij de berekening van de RGR. Het versgewicht is samengesteld uit 3 spruiten. De planten waren 14 dagen oud en hadden 7 dagen in de tonnen gestaan. De RGR van deze planten werd bepaald ten opzichte van de begin gewichten van de planten die 7 dagen oud waren en op het punt stonden de tonnen in te gaan.

leeft. plant [dagen]	vers- gewicht (FW) [g]	ln (FW)	RGR  [g/g/ dag]
7	0.153	-1.877	
7	0.198	-1.619	
7	0.176	-1.737	
7	0.215	-1.537	
7	0.135	-2.002	
7	0.237	-1.440	
7	0.160	-1.833	
7	0.158	-1.845	
7	0.164	-1.808	
14	0.658	-0.419	0.208
14	0.661	-0.414	0.172
14	0.805	-0.217	0.217
14	0.781	-0.247	0.184
14	0.804	-0.218	0.255
14	0.857	-0.154	0.184
14	0.666	-0.406	0.204
14	0.631	-0.460	0.198
14	0.624	-0.472	0.191

De gemiddelde waarde van de RGR kolom is  $0.20 \pm 0.02$  en die waarde is o. a. terug te vinden in tabel 1 op pag. 19.

**Bijlage 4.** Voorbeeld van de berekening van spruit geleiding voor H<sub>2</sub>O damp (q(H<sub>2</sub>O)) en die voor H<sub>2</sub>S (q(H<sub>2</sub>S)) van spinazie (cv. Estivato). Hiervoor zullen de gegevens van de controle planten die 8 dagen oud zijn en 24 uur in de tonnen hebben gestaan worden gebruikt en zal de methode worden gebruikt die beschreven is door De Kok et al. (11). Tevens zijn in de laatste tabel alle resultaten weergegeven.

**Tabel 15.** Overzicht gebruikte gegevens bij de berekening van de spruit geleiding voor H<sub>2</sub>O (q(H<sub>2</sub>O)) en H<sub>2</sub>S (q(H<sub>2</sub>S)) van spinazie die 24 uur in de controle ton heeft gestaan. De temperatuur in de ton was gemiddeld 23.1 °C, de relatieve vochtigheid was gemiddeld 48 % in die periode.

FW pot verpakt [g]	FW plant [g]	J(H <sub>2</sub> O) [mmol g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	C <sub>int</sub> (H <sub>2</sub> O) [mmol l <sup>-1</sup> ]	C <sub>o</sub> (H <sub>2</sub> O) [mmol l <sup>-1</sup> ]	q(H <sub>2</sub> O) [g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	q(H <sub>2</sub> S) [g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
0.321	0.041	22.00	1.16	0.52	34.61	25.27
0.519	0.083	17.57	1.16	0.52	27.64	20.18
1.012	0.068	41.82	1.16	0.52	65.79	48.03 3

De gemiddelden van q(H<sub>2</sub>O) en q(H<sub>2</sub>S) over deze 3 metingen zijn 42.7 ± 20.3 resp. 31.2 ± 14.8 l g FW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Verdere verklaring van de berekende waarden:

J(H<sub>2</sub>O) = de transpiratiesnelheid in mmol g FW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>  
en wordt als volgt berekend:

$$J(H_2O) = \frac{(FW\ pot : 18.02)}{FW * h} * 10^3$$

waarin h 19.75 uur in deze proef;

C<sub>int</sub>(H<sub>2</sub>O) = waterdamp massa in het blad in mmol l<sup>-1</sup>, die berekend kan worden met de volgende formule:

$$C_{i_{nt}}(H_2O) = \frac{\exp(0.0552504 * T + 1.75323)}{18}$$



waarin T de temperatuur in °C is;  
 $C_o(H_2O)$  = waterdampmassa in de omringende lucht in mmol  
 $l^{-1}$ , wat als volgt is te berekenen:

$$C_o(H_2O) = RV * C_{i_{nt}}(H_2O)$$

$q(H_2O)$  = geleiding van de spruit voor waterdamp-efflux in  
 $l\ g\ FW^{-1}\ h^{-1}$ , wat berekend wordt met de volgende  
formule:

$$q(H_2O) = \frac{J(H_2O)}{[C_{i_{nt}}(H_2O) - C_o(H_2O)]}$$

$q(H_2S)$  = geleiding van de spruit voor  $H_2S$ -influx in  $l\ g\ FW^{-1}\ h^{-1}$ , wat als volgt is te berekenen:

$$q(H_2S) = 0.73 * q(H_2O)$$

In onderstaande tabel worden alle resultaten nog eens weergegeven.

Tabel 16. Effect van 0, 500 piek en 500 ppb H<sub>2</sub>S op de geleiding van de spruit van spinazie (cv. Estivato) voor waterdamp-efflux (q(H<sub>2</sub>O)) en H<sub>2</sub>S-influx (q(H<sub>2</sub>S)). De pieken duurden elk 2 uur. In totaal werden 5 pieken binnen 24 uur gegeven (zie "behandeling 6", pag. 11). De geleiding voor H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub>S werd over de eerste en tweede periode van 24 uur bepaald gedurende de proef. Weergegeven zijn de gemiddelden van 3 enkelvoudige metingen ± SD. De verschillende letters geven de significantie niveaus aan welke in een ANOVA-test (P < 0.05 volgens Tukey-HSD methode) werden bepaald.

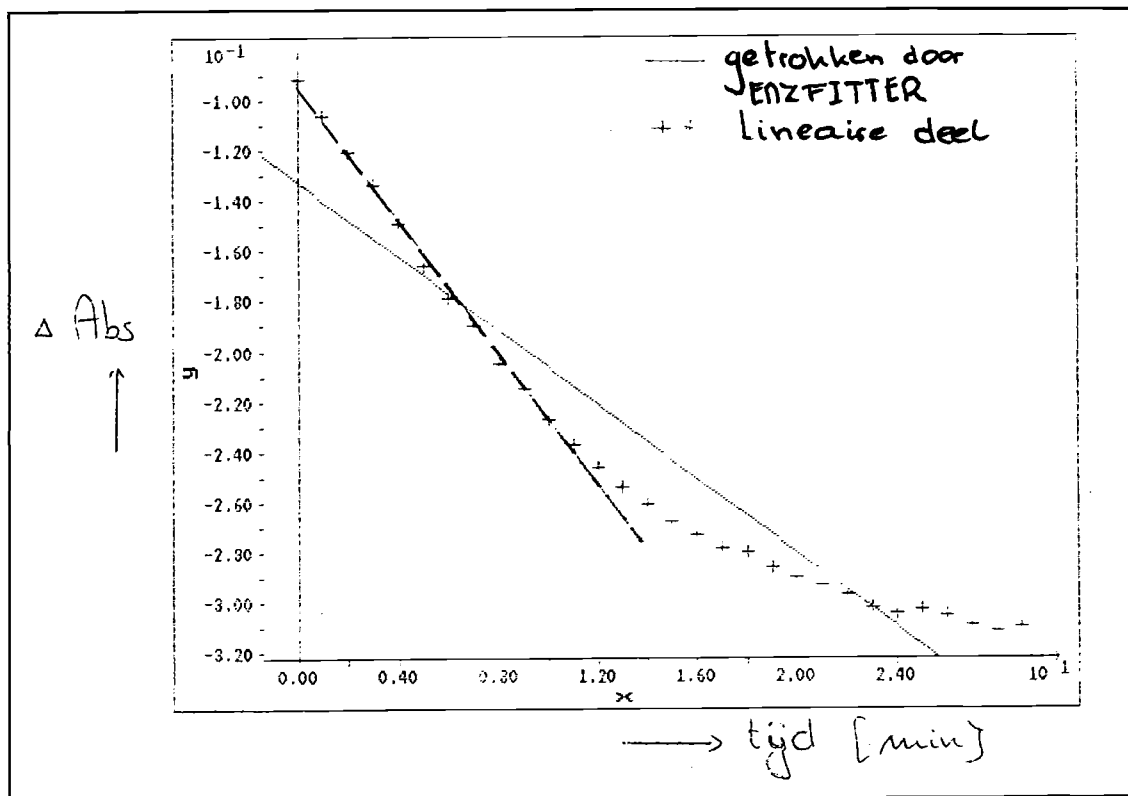
leeft. plant [dagen]	begas. duur [dagen]	H <sub>2</sub> S [ppb]	q(H <sub>2</sub> O)	qH <sub>2</sub> S)
			[1 g FW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	
8	1	0	42.7 ± 20.3a	31.2 ± 14.8a
8	1	500piek	60.5 ± 18.3a	44.2 ± 13.3a
8	1	500	37.1 ± 10.9a	27.1 ± 7.9a
9	2	0	45.5 ± 0.7a	33.2 ± 0.5a
9	2	500piek	96.1 ± 43.2a	70.1 ± 31.6a
9	2	500	51.0 ± 22.5a	37.2 ± 16.4a

**Bijlage 5.** Uitwerking details in vitro NADH oxydatie capaciteits bepaling. In dit voorbeeld werd de ox. cap. bepaald aan één spruit van een controle plant, die 20 dagen oud was en 14 dagen in de begassingston had gestaan (zie "experiment 2", pag. 21).

De inhoud van de cuvetten die met behulp van de spectrofotometer werden doorgemeten was als volgt:

Referentie cuvet	2.4 ml $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ (50 mM; pH 7.5); 0.2 ml $H_2O$ ;
cuvet 1	2.0 ml $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ; 0.4 ml plant extract (in $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ); 0.2 ml $NaHCO_3$ (5 % w/v);
cuvet 2	2.4 ml $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ; 0.2 ml NADH (1mM in 5 % $NaHCO_3$ , w/v);
cuvet 3	2.0 ml $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ; 0.4 ml plant extract 0.2 ml NADH

Voor het programma ENZFITTER werden de waarden van de absorptie van cuvet (3-2-1) ingevoerd, wat in dit geval leidde tot onderstaande grafiek.



**Grafiek 1.** Absorptie plantenextract + NADH tegen de tijd. Daar de enzymen in het extract de NADH omzetten in  $\text{NAD}^+$  en  $\text{H}^+$  daalt de absorptie in de tijd. De gradiënt van het lineaire deel van de grafiek werd in de berekening van de NADH ox. cap. gebruikt. Deze gradiënt werd door ENZFITTER berekend.

**Bijlage 6.** Toelichting op de statistiek die toegepast werd bij de verwerking van alle gegevens. De uitkomsten van experiment 5 (zie pag. 33) werden, als een soort vergelijkend waren onderzoek, verwerkt met behulp van 6 verschillende toetsen nl. de t-test en 5 testen die werden voorafgegaan door een ANOVA.

De 5 testen die op een ANOVA kunnen volgen zijn:

- 1) De Fisher's Least Significant Difference (LSD-test);
- 2) Duncan's new multiple range test;
- 3) de Student Newman Keuls procedure (SNK-test);
- 4) de Tukey's Honestly Significant Difference test (Tukey-HSD-test);
- 5) Scheffe's method.

In het nu volgende deel zullen alleen de data worden besproken, welke bepaald werden aan spinazie van 9 dagen oud die begast werden met 0, 210, 500 ppb en 500 piek (à 2 uur) H<sub>2</sub>S volgens de methode die beschreven staat onder "Behandeling 6" op pag. 11.

**Tabel 17.** Een overzicht van de in vitro NADH oxydatie capaciteit in planten die 2 dagen begast zijn met 0, 210, 500 ppb H<sub>2</sub>S en 500 ppb gedurende pieken van 2 uur. Alle planten waren 9 dagen oud (zie ook "Bijlage 5").

H <sub>2</sub> S [ppb]	NADH ox.cap. [μmolgFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	H <sub>2</sub> S [ppb]	NADH ox.cap. [μmolgFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
0	6	500piek	7.179
0	6.471	500piek	4.2
0	5.475	500piek	5.995
0	10.553	500piek	5.325
0	7.5	500piek	9.793
0	9.041	500piek	6.064
210	4.8	500	1.725
210	4.714	500	2.571
210	4.339	500	3.45

Voordat gewerkt mocht worden met een ANOVA test moest eerst worden gecheckt of de data wel aan de modelvoorwaarden voldeden. De belangrijkste en gevoeligste hiervan was, dat de

Tabel 18. Vergelijking van de uitkomst van de verschillende statistische toetsen. Als gevolg van een toegepaste worteltransformatie op de originele data levert "terug transformatie" een gemiddelde waarde {vet} voor de NADH ox. cap. met een scheve verdeling van de SD. op. De spinazie was 9 dagen oud en werd gedurende 2 dagen begast met 0, 210, 500 ppb H<sub>2</sub>S en met 500 ppb gedurende pieken van 2 uur.

H <sub>2</sub> S [ppb]	NADH ox.cap. [μmol gFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	t- test	LSD	Dunc	SNK	Tukey	Schef- fe
0	5.6 {7.4} 9.4	a	a	a	a	a	a
210	4.4 {4.6} 4.9	ab	bc	bc	ab	ab	ab
piek2	4.6 {6.3} 8.3	a	ab	ab	a	a	a
500	1.7 {2.5} 3.5	b	c	c	b	b	b

Uit bovenstaande tabel blijkt, dat de LSD- en Duncan-test resp. t-toets, SNK, Tukey en Scheffe dezelfde uitslag geven. Uit alle testen volgt, dat de NADH ox. cap. van de planten die met piekconcentraties werden begast hoger lag ten opzichte van die in de met 500 ppb begaste planten, maar ongeveer gelijk was aan datgene wat in de met 210 ppb begaste planten gevonden werd. Het grote verschil in de testen is de significantie tussen de controle planten en de met 210 ppb H<sub>2</sub>S begaste planten. Volgens de LSD en Duncan is de NADH ox. cap. in de controle planten significant groter, terwijl dat bij de overige testen niet zo is. Het verschil tussen de toetsen LSD t/m Scheffe is, dat van links naar rechts, de power van de test afneemt (power d.w.z. de waarschijnlijkheid voor het vinden van significante verschillen, Scheffe is dus de strengste toets waarin het zeer moeilijk is aan te tonen of waarden significant verschillend zijn), echter de kans op het maken van een type I error (d.w.z. de nul hypothese verwerpen terwijl deze wel juist is) afneemt. Zodoende bleek Tukey's Honestly Significant Difference (de naam zegt het al) een goede test te zijn (subjectief), zodat besloten werd alle gegevens met behulp van deze toets te verwerken (32).

Op de pagina's hierna staan de SPSS-uitdraaien afgebeeld.

Test of data van de publiciteit (a 2 uur, pinnen van g dagen oud) gepaald mogen worden

MORE

CONC	BELEF GAS	MOE	WORTEL
		MAX	COEF
3.0	1.0 500piet	7.2	2.1
3.0	1.0 500piet	4.2	2.0
3.0	1.0 500piet	6.0	2.4
3.0	2.0 500piet	5.3	2.3
3.0	2.0 500piet	7.8	3.1
3.0	2.0 500piet	6.1	2.5

ONEWAY VARIABLES WORTEL IS BELEF (1,1) STATISTICS 2.

MORE

----- ONEWAY -----

MORE

Variable WORTEL

By Variable BELEF

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	.0869	.0869	.5950	.4835
Within Groups	4	.5845	.1461		
Total	5	.6714			

Concl: no treatment effect, perken ok

Tests for Homogeneity of Variances (Statistics 3)

Cochran's C = Max. Variance/Sum(Variances) = .6524. F = .695 (Approx.)  
 Bartlett-Box F = .195. F = .696  
 Maximum Variance / Minimum Variance = 1.877

G<sup>2</sup> homogen

L-testen op significantie worden geleerd. Alle planten waren 9 dagen oud

MORE

CONC	GAS	NDC NADP ox. op	WORTEL VADP ox. op
1.0	.0	6.0	2.4
1.0	.0	6.5	2.5
1.0	.0	5.5	2.3
1.0	.0	10.6	3.2
1.0	.0	7.5	2.7
1.0	.0	9.0	3.0
2.0	500.0	1.7	1.3
2.0	500.0	2.6	1.6
2.0	500.0	3.5	1.9
3.0	210.0	4.8	2.2
3.0	210.0	4.7	2.2
3.0	210.0	4.3	2.1
4.0	pick	7.2	2.7
4.0	pick	4.2	2.0
4.0	pick	6.0	2.4
4.0	pick	5.3	2.3
4.0	pick	9.8	3.1
4.0	pick	6.1	2.5

Number of cases read = 18 Number of cases listed = 18

Ingevoerde commando's voor ANOVA test uitgevoerd door  
LSD via Scheffe  
ONEWAY /VARIABLES WORTEL BY CONC (1,4)

MORE

```

/RANGES LSD
/RANGES DUNCAN
/RANGES SNK
/RANGES TUKEY
/RANGES SCHEFFE
/STATISTICS ALL.

```

Resultaat Statistics All

MORE

----- ONEWAY -----

Variable WORTEL

By Variable CONC

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	2.8282	.9427	9.1853	.0013
Within Groups	14	1.4369	.1026		
Total	17	4.2651			

Concl. er is treatment effect

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	6	2.7212	.3495	.1427	2.3544 To 3.0879
Grp 2	3	1.5914	.2722	.1572	.9152 To 2.2676
Grp 3	3	2.1484	.0574	.0332	2.0057 To 2.2910
Grp 4	6	2.5128	.3665	.1496	2.1282 To 2.8973
Total	18	2.3680	.5009	.1181	2.1189 To 2.6170
Fixed Effects Model			.3204	.0755	2.2060 To 2.5299
Random Effects Model				.2440	1.5913 To 3.1446

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance .1939

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	2.3399	3.2485
Grp 2	1.3134	1.8574
Grp 3	2.0830	2.1909
Grp 4	2.0494	3.1294
Total	1.3134	3.2485

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .4023, F = .623 (Approx.)  
 Bartlett-Box F = 1.556, F = .201  
 Maximum Variance / Minimum Variance 40.767

Concl.  
C<sup>2</sup> homogen.



Multiple Range Test

LSD Procedure

Ranges for the .050 level -

$$3.03 \quad 3.03 \quad 3.03 \Rightarrow t_{0.025}^{(14)} \cdot \sqrt{2} = 2.145 \cdot \sqrt{2} = 3.03$$

The ranges above are table ranges.  
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$$.2265 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$$

$$\sqrt{\frac{MS_{\text{within}}}{2}}$$

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Mean	Group	2	3	4	1
1.5914	Grp 2				
2.1484	Grp 3				
2.5128	Grp 4	*			
2.7212	Grp 1	*	*		

⇒

o	a
210	bc
piek	ab
500	c

Let op!

Grp 1 = 0  
Grp 2 = 500  
Grp 3 = 210  
Grp 4 = piek

Duncan Procedure

Ranges for the .050 level -

$$3.03 \quad 3.17 \quad 3.28$$

$$3.03 = d_{0.05}^{(2,14)}$$

$$3.17 = d_{0.05}^{(3,14)}$$

$$3.28 = d_{0.05}^{(4,14)}$$

The ranges above are table ranges.  
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$$.2265 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$$

$$\sqrt{\frac{MS_{\text{within}}}{2}}$$

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Mean	Group	2	3	4	1
1.5914	Grp 2				
2.1484	Grp 3				
2.5128	Grp 4	*			
2.7212	Grp 1	*	*		

⇒

o	a
210	bc
piek	ab
500	c

Student-Newman-Keuls Procedure

Ranges for the .050 level -

$$3.04 \quad 3.69 \quad 4.11$$

$$3.04 = q_{0.05}^{(2,14)}$$

$$3.69 = q_{0.05}^{(3,14)}$$

$$4.11 = q_{0.05}^{(4,14)}$$

The ranges above are table ranges.  
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$$.2265 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$$

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Mean	Group	2	3	4	1
1.5914	Grp 2				
2.1484	Grp 3				
2.5128	Grp 4	*			
2.7212	Grp 1	*	*		

⇒

o	a
210	ab
piek	a
500	b

Tukey-HSD Procedure

Ranges for the .050 level -

$$4.11 \quad 4.11 \quad 4.11 \quad , \quad q_{0.05}^{(4,14)}$$

The ranges above are table ranges.  
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$$.2265 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$$

$$\sqrt{\frac{MS_{\text{within}}}{2}}$$

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Mean	Group	2	3	4	1
1.5914	Grp 2				
2.1484	Grp 3				
2.5128	Grp 4	*			
2.7212	Grp 1	*			

Scheffe Procedure

Ranges for the .050 level =

$$4.48 \quad 4.48 \quad 4.48 \quad \sqrt{2.3 \cdot F_{0.05}^{(10)}} \quad \sqrt{6.534} \quad 4.48$$

The ranges above are table ranges.  
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is:  
.2265 \* Range \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Mean	Group	2	3	4	1
1.5914	Grp 2				
2.1484	Grp 3				
2.5128	Grp 4	*			
2.7212	Grp 1	*			

Resultat von der t-Testen. Ja,  $P < 0.05$  = 0.008 das ist ein sign. versand anwering

Independent samples of CONC

Group 1: CONC EQ 1.0      Group 2: CONC EQ 2.0

t-test for: WORTEL

	Number of Cases	Mean	Standard Deviation	Standard Error
Group 1 = 0	6	2.7212	.349	.143
Group 2 = 500	3	1.5914	.272	.157

F Value	2-Tail Prob.	Pooled Variance Estimate		Separate Variance Estimate		
		t Value	Degrees of Freedom	t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.
1.65	.838	4.85	7	5.32	5.23	.003

$G_1 = G_2$  dus pooled variance

$0 \neq 500$

MORE

Group 1: CONC EQ 1.0      Group 2: CONC EQ 3.0

t-test for: WORTEL

	Number of Cases	Mean	Standard Deviation	Standard Error
Group 1 = 0	6	2.7212	.349	.143
Group 2 = 210	3	2.1484	.057	.033

F Value	2-Tail Prob.	Pooled Variance Estimate		Separate Variance Estimate		
		t Value	Degrees of Freedom	t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.
37.02	.053	2.73	7	3.91	5.51	.009

$G_1 = G_2$ , dus "pooled var."

$0 = 210$

t-test for: WORTEL

	Number of Cases	Mean	Standard Deviation	Standard Error
Group 1 = 0	6	2.7217	.349	.143
Group 2 = pick	6	2.5128	.366	.150

F Value	2-Tail Prob.	Pooled Variance Estimate			Separate Variance Estimate		
		t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.	t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.
1.10	.920	1.01	10	.337	1.01	9.98	.337

$G_1^2 = G_2^2$ , dus  
pooled var.

0 = pick

Group 1: CONC EQ 2.0      Group 2: CONC EQ 3.0

t-test for: WORTEL

	Number of Cases	Mean	Standard Deviation	Standard Error
Group 1 = 500	3	1.5914	.272	.157
Group 2 = 210	3	2.1484	.057	.033

F Value	2-Tail Prob.	Pooled Variance Estimate			Separate Variance Estimate		
		t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.	t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.
22.46	.085	-3.47	4	.026	-3.47	2.18	.066

$G_1^2 = G_2^2$ , dus  
pooled var.

500 = 210

Group 1: CONC EQ 2.0      Group 2: CONC EQ 4.0

t-test for: WORTEL

	Number of Cases	Mean	Standard Deviation	Standard Error
Group 1 = 500	3	1.5914	.272	.157
Group 2 = pick	6	2.5128	.366	.150

F Value	2-Tail Prob.	Pooled Variance Estimate			Separate Variance Estimate		
		t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.	t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.
1.81	.785	-3.81	7	.007	-4.25	5.47	.007

$G_1^2 = G_2^2$ , dus  
pooled var.

500 / pick

Group 1: CONC EQ 3.0      Group 2: CONC EQ 4.0

t-test for: WORTEL

	Number of Cases	Mean	Standard Deviation	Standard Error
Group 1 = 210	3	2.1484	.057	.033
Group 2 = pick	6	2.5128	.366	.150

F Value	2-Tail Prob.	Pooled Variance Estimate			Separate Variance Estimate		
		t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.	t Value	Degrees of Freedom	2-Tail Prob.
40.71	.048	-1.66	7	.142	-2.38	5.47	.059

$G_1^2 = G_2^2$ , dus  
pooled var.

210 = pick

MORE

This procedure was completed at 14:51:26

Conclusie      0      a  
                   210      ab  
                   pick      a      500 =