

Burkholderia community structure in soils

under different agricultural management

J.F. Salles

Op 13 April 2005 promoveerde *Johana F. Salles* aan de Universiteit Leiden op het proefschrift getiteld '*Burkholderia community structure in soils under different agricultural management*'. Promotoren waren Prof. dr. J.A. van Veen (Universiteit Leiden, NIOO Heteren) en Prof. Dr. J.D. van Elsas (Universiteit Groningen). Het onderzoek werd gefinancierd door de 'Brazilian Council for Scientific and Technological Development' (CNPq) en door het Ministerie van LNV.

Inleiding

Het geslacht *Burkholderia* vertegenwoordigt een interessante groep bacteriën die in verschillende habitats voorkomen, i.e. van bodem tot water en vaak in nauw verband met planten, schimmels, insecten, hogere diersoorten en de mens. De mate van interactie hangt af van het organisme waarmee *Burkholderia* is geassocieerd. In het geval van bijvoorbeeld schimmels en mieren is er sprake van een symbiotische relatie waarbij genoemde gastheren profiteren van de aanwezigheid van *Burkholderia*. Maar in de relatie met dieren en mensen kunnen sommige *Burkholderia* soorten zich als schadelijke pathogenen gedragen en ziektes als 'glanders' en 'meloidosis veroorzaken'. Ook kan *Burkholderia* van het zogenaamde *cepacia* complex bij taaislijmziekte bij de mens betrokken zijn.

De associatie van *Burkholderia* met planten kan zowel in het voordeel van de plant als ook in haar nadeel zijn, d.w.z. er kunnen ook plantpathogene interacties zijn. Niet-pathogene *Burkholderia* soorten koloniseren de plant vaak in de rhizosfeer (rondom wortelstelsels). Sommige soorten kunnen zich zelfs in de plant vestigen. In de laatste situatie kan *Burkholderia* de groei van de plant stimuleren, atmosferische stikstof binden en bescherming bieden aan de plant tegen pathogenen door de productie van antibiotica. Deze *Burkholderia* soorten kunnen daarmee een rol spelen bij de bescherming van het gewas, hetgeen een vorm van biologische ziektebestrijding biedt waarmee het gebruik van chemische beschermingsmiddelen in de landbouw teruggebracht of zelfs uitgesloten kan worden. Dit geeft, naast economische, ook ecologische voordelen. Biologische gewasbescherming kan dus bereikt worden door toevoeging van antagonistische organismen in een omgeving waar een ziekte heerst. Vaak zijn deze geïntroduceerde soorten echter niet aangepast aan de nieuwe leefomgeving en daarom niet in staat zich te vestigen binnen de al aanwezige microbiële gemeenschap. Het gevolg is dat een potentiële beschermer de plant niet efficiënt kan koloniseren. Een ecologisch alternatief in de strijd tegen plantpathogenen is het stimuleren van de van nature al aanwezige antagonisten, via een uitgekende bewerking van de bodem en het gewas.

In het proefschrift wordt beschreven hoe *Burkholderia* soorten zich ontwikkelen bij verschillende landbouwstrategieën en welke soort geselecteerd kan worden door een bepaald gewas of bij een rotatie van gewassen. Het begrijpen van de ecologie van specifieke *Burkholderia* soorten en met name de antagonistische *Burkholderia* soorten, geeft de mogelijkheid om door het landgebruik deze soorten te stimuleren en hierdoor de intrinsieke weerstand van de bodem tegen plantenziekten te verhogen.

Verspreiding, diversiteit en detectie

In het proefschrift wordt de soort *Burkholderia* beschreven in termen van zijn verspreiding, diversiteit, voorkomen en mogelijkheden. Vervolgens worden de gevolgen van antropogene verstoringen op de microbiële diversiteit in de bodem beschreven en in het bijzonder het effect van landgebruik op microbiële gemeenschappen die geassocieerd zijn met grasland en akkerbouw en de gevolgen voor de microbiële gemeenschap in de bodem bij een verandering van landbouwstrategie. In deze studie is een PCR-DGGE methode ontwikkeld voor de specifieke bepaling van *Burkholderia* gemeenschappen in de bodem. Hiervoor zijn primers ontworpen op basis van het 16S

PROMOTIE

ribosomale RNA (rRNA) gen dat specifiek het DNA van bacteriesoorten binnen het geslacht *Burkholderia* amplificeert. De bruikbaarheid van de primers is geëvalueerd, *in silico* (op de databank met DNA sequenties), *in vitro* (met DNA van *Burkholderia* en niet *Burkholderia* soorten) en door middel van sequenties van PCR producten uit bodem DNA. Voor de validatie van de methode is bodem DNA geëxtraheerd uit de bulk en rhizosfeer van twee grasland plots. Er werden verschillen gevonden in de diversiteit van *Burkholderia* soorten tussen de bodemmonsters uit de bulk en rhizosfeer.

Invloed landgebruik

Na de ontwikkeling en validatie van de moleculaire methode is de invloed van landgebruik op de *Burkholderia* gemeenschap onderzocht in een microcosmos experiment in de kas. Hiervoor zijn vier gewassen (maïs, haver, gerst en gras) getest die ieder drie groeicycli doormaakten in potten met landbouwgrond van velden met een verschil in landgebruik, te weten: maïs in monocultuur, gewasrotatie en permanent grasland. DGGE patronen van de *Burkholderia* gemeenschappen zijn geanalyseerd met behulp van de multivariant analyse CCA. Uit deze analyse bleek dat de belangrijkste factor met invloed op de samenstelling van deze gemeenschappen de gebruikshistorie van de grond was. Zelfs na drie groeicycli was de invloed van de landgebruikshistorie nog aanwezig. Alleen bij een analyse op basis van de herkomst van de grond werd de invloed van de verschillende gewassen aangetoond. Zo waren er overeenkomsten tussen de *Burkholderia* populaties bij maïs en gras en bleken de populaties bij haver en gerst vergelijkbaar. De twee sets planten waren negatief met elkaar gecorreleerd.

Voor het bepalen van de invloed van de landgebruikshistorie en het actuele landgebruik op de *Burkholderia* populatie, zijn bodemmonsters genomen op proefvelden met voorgaand gebruik als grasland of akkerbouw. Op deze velden zijn voor de periode van dit onderzoek de volgende drie regimes toegepast; een rotatie (haver, maïs, gerst, aardappel), maïs in monocultuur en grasland. Er zijn 254 *Burkholderia* isolaten geïsoleerd uit vier behandelingen: permanent grasland, grasland omgezet naar maïs in monocultuur, akkerbouwgrond met maïs in monocultuur en akkerbouwgrond omgezet naar permanent grasland. De isolaten zijn gegroepeerd in 47 clusters op basis van hun PCR-DGGE en BOX patronen. De 'Shannon diversity index' liet zien dat de diversiteit van *Burkholderia* in de bodem beïnvloed wordt door veranderingen in het landgebruik. Permanent grasland en de continue teelt van akkerbouwgewassen vertoonden de hoogste diversiteit. Daarnaast leek de diversiteit in de rhizosfeer hoger dan die in de bulkgrond. Statistische analyse volgens 'species abundance modeling' liet zien dat *Burkholderia* gemeenschappen in de rhizosfeer een gelijkmatiger verdeling lieten zien dan de gemeenschappen in de bulksfeer. Identificatie van de isolaten wees uit dat 98% behoort tot nog niet beschreven soorten, terwijl 2% toe te kennen was aan het 'cepacia complex'.

Antagonistische *Burkholderia* soorten

Vervolgens zijn de effecten van de veranderingen in het landgebruik op de totale *Burkholderia* populatie geanalyseerd met een multivariant analyse op de PCR-DGGE profielen van grondmonsters uit het veldexperiment. De analyse toonde aan dat gedurende het

vierjarige veldexperiment de structuur van de *Burkholderia* gemeenschap bij een conversie van grasland naar akkerbouw zich heeft gevormd naar de nieuwe omgeving. Dezelfde periode was echter niet voldoende voor het ontwikkelen van een *Burkholderia* gemeenschap, in een omzetting van bouwland naar grasland, die verwacht kon worden onder permanent grasland. Na de conversie van akkerbouw naar grasland bleef de *Burkholderia* gemeenschapsstructuur van akkerbouw zichtbaar. Uit de analyse bleek verder dat na de omzetting van permanent grasland naar akkerbouw (bij maïs in monocultuur en de rotatie), grondbewerking en bemesting meer effect hadden op de samenstelling van de *Burkholderia* gemeenschap dan het nieuwe landgebruik. In de hoop landgebruik te koppelen aan een stimulus van een voor de landbouw belangrijke functionele groep van het geslacht *Burkholderia*, zijn isolaten geselecteerd die een remmend effect hadden op de bodemschimmel *Rhizoctonia solani* AG 3, een bodem-gerelateerd pathogeen van aardappel. Uit de resultaten bleek dat de veranderingen in landgebruik (voornamelijk rotatie) invloed hadden op de frequentie waarmee antagonistische *Burkholderia* soorten geïsoleerd worden. In vergelijking daarmee bevatte permanent grasland een groot reservoir van deze *Burkholderia* soorten met mogelijkheden voor gewasbescherming.

Conclusie en vooruitblik

De voornaamste conclusie van deze studie is dat het voorgaande bodemgebruik een groot effect heeft op de structuur van de *Burkholderia* gemeenschap in de grond en dat de tijd die nodig is voor de ontwikkeling van de te verwachten *Burkholderia* gemeenschap afhangt van de doorgevoerde veran-

deringen in het landgebruik. Verder blijkt dat bewerking van de grond en bemesting een belangrijke rol spelen en het veranderingsproces versnellen. Analyse van de cultiveerbare *Burkholderia* soorten toonde aan dat de diversiteit

binnen de *Burkholderia* gemeenschappen beïnvloed werd door de veranderingen in landgebruik. Bodemden waar al meer dan vierentwintig jaar grasland ligt of akkerbouw plaatsvindt hadden de hoogste diversiteit binnen de aan-

wezige *Burkholderia* gemeenschap. Naast hoge diversiteit had grasland een opmerkelijk stimulerend effect op *Burkholderia* soorten met gewasbeschermende eigenschappen tegen plantpathogenen.

PROMOTIE