

Bodempathogenen en bodemmicrobiologie

Samenvattingen van de presentaties gehouden op de bijeenkomst van de KNPV-werkgroep Bodempathogenen en bodemmicrobiologie op 27 maart 2014 te Lelystad.

Vergelijking van de genomsequenties en metabolietprofielen van vijf *Lysobacter*-stammen geïsoleerd uit de bodem

Irene de Bruijn^{1,2},
Xu Cheng², Ruth Gomez
Exposito^{1,2}, Nrupali
Patel⁴, Joeke Postma³,
Donald Kobayashi⁴,
Jeramie Watrous⁵,
Pieter Dorrestein⁵ &
Jos M. Raaijmakers¹

¹ NIOO-KNAW, Department of
Microbial Ecology, Wageningen,
The Netherlands

² Laboratory of Phytopathology,
Wageningen University,
Wageningen, The Netherlands

³ Plant Research International,
Wageningen, The Netherlands

⁴ Rutgers The State University
of New Jersey, New Brunswick,
NJ, USA

⁵ Departments of Pharmacology;
Chemistry and Biochemistry;
Center for Marine Biotechnology
and Biomedicine, Scripps
Institution of Oceanography;
Skaggs School of Pharmacy
and Pharmaceutical Sciences,
University of California at San
Diego, La Jolla, USA

Lysobacter is een Gram-negatieve bacterie die in vele ecosystemen voorkomt, onder andere in de bodem, de rhizosfeer en in zoet water.

De verschillende soorten hebben antimicrobiële activiteit tegen een breed scala aan (micro-) organismen waaronder bacteriën, schimmels, oomyceten en nematoden. Ze produceren verschillende lytische enzymen en andere antibiotica waarvan er nog maar enkele zijn gekarakteriseerd.

Voor dit project zijn verscheidene *Lysobacter*-stammen geïsoleerd uit bodems die ziekteondrukkend zijn met betrekking tot de plant-pathogene schimmel *Rhizoctonia solani*. Deze *Lysobacter*-stammen hebben chitinase- en β -1,3-glucanase-activiteit en een sterke *in vitro*-activiteit tegen *R. solani* en andere schimmels en oomyceten. Welke bioactieve stoffen of genen/genclusters verantwoordelijk zijn voor deze activiteit is niet bekend en het achterhalen hiervan is één van de doelstellingen in het project.

De genom-sequenties van stammen van *L. enzymogenes*, *L. capsici* en *L. gummosus* en twee *L. antibioticus*-stammen zijn verkregen en met

elkaar vergeleken. In elke stam zijn genclusters geïdentificeerd die mogelijk coderen voor de productie van bioactieve stoffen. Sommige genclusters zijn aanwezig in meerdere stammen, maar ook unieke genclusters zijn geïdentificeerd. Naast genetische analyse, zijn ook chemische analyses uitgevoerd door middel van MALDI imaging-massaspectrometrie. Naast bepaling van een spectrum van de massa's van alle stoffen die geproduceerd worden door de *Lysobacter*-stammen, kan ook de distributie van bepaalde componenten binnen of buiten de bacteriekolonie met deze methode worden gevisualiseerd.

We hebben kunnen aantonen dat de massa's van een aantal stoffen overeen komen met de producten van de geïdentificeerde genclusters in de genom-sequenties. Bovendien hebben we het chemische profiel bekeken van de *Lysobacter*-stammen in een interactie met *R. solani* en daarmee inzicht gekregen in welke stoffen mogelijk betrokken zijn bij de groeiremming van de schimmel.

STW-project 11755

Nematoden als bioindicatoren

Gerard Korthals en
Johnny Visser

Bodem-gebonden nematoden (aaltjes) zijn zeer talrijk en soortenrijk, en vormen een belangrijk onderdeel van het hele bodemvoedselweb. Mede hierdoor is er al vaak onderzocht of nematodengemeenschappen (plant-parasitaire en niet plant-parasitaire aaltjes) indicatief kunnen zijn voor de bodemkwaliteit. Er bestaan al goede voorbeelden waarbij je aan een nematodengemeenschap kunt aflezen van welke grondsoort deze afkomstig is, of dat er sprake is van verontreiniging en of de locatie al dan niet gezond is. Een probleem bij de interpretatie van nematodengemeenschappen is dat er vaak zeer veel informatie is over aantallen aaltjes, soortenrijkdom, voedselgroepen etc. De grote vraag is hoe dergelijke informatie goed valt samen te vatten, zodat de interpretatie eenvoudiger wordt.

Hiervoor zijn steeds meer indexen of andere parameters ontwikkeld, zoals de Maturity Index (Bongers, 1990) en meer afgeleide indices (Ferris & Bongers, 2009) etc. die de (statistische) verwerking en interpretatie van dergelijke grote en ingewikkelde datasets verbeteren.

In 2014 is een mooie hulpmiddel ontwikkeld, namelijk NINJA: Nematode Indicator Joint Analysis (Sieriebriennikov *et al.*, 2014). Via de website <http://spark.rstudio.com/bsierieb/ninja/> kun je je eigen nematodendata uploaden, waarna de nematoden worden ingedeeld in voedselgroepen en een eigen *Colonizer-Persister*-waarde krijgen, waarmee automatisch zeer veel verschillende indices (*Maturity Index*, PPI, CI, EI, BI, SI) berekend worden. Daarnaast helpt NINJA met het

uitvoeren van de statistiek en het verwerken van de gegevens in tabellen en figuren. Dit gebeurt allemaal automatisch en kosteloos! Kortom een zeer mooie aanwinst voor de nematologie en uniek in de wereld. Een extra reden om ook onderzoek te gaan doen aan aaltjesgemeenschappen en te beoordelen voor welke bodemkwaliteitsaspecten deze organismen goede bioindicatoren zijn!

Bongers T, 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition, *Oecologia* 83.

Ferris H & T. Bongers T, 2009. Indices for analysis of nematode assemblages, in: Wilson M, Kakouli-Duarte T (eds.), *Nematodes as Environmental Bioindicators*, CABI, Wallingford.

Sieriebriennikov B, Ferris H & de Goede RGM, 2014. NINJA: An automated calculation system for nematode-based biological monitoring. *European Journal of Soil Biology* 61: 90-93.

Inoculumdichtheid van bodempathogenen: theorie en praktijk

Aad Termorshuizen

*SoilCares Research
(voorheen BLGG Research),
Binnenhaven 5,
6709 PD Wageningen*

Het inoculum van een pathogeen is de hoeveelheid biomassa die beschikbaar is voor infectie. Inoculumdichtheid wordt uitgedrukt als het aantal sporen (propagels) per eenheid grond, in gewichts- of volume-eenheid. De inoculumdichtheid wordt bepaald om te komen tot een bepaalde voorspelling van het optreden van een ziekte of om effecten van behandelingen te evalueren. Bij het vergelijken van inoculumdichtheden van bodempathogenen in verschillende gronden is het relevant om de inoculumdichtheid uit te drukken per volume-eenheid grond. Relevant zou ook kunnen zijn om de inoculumdichtheid uit te drukken per eenheid van poriënvolume van de grond. Voor beide laatste is het nodig de bulkdichtheid van grond te kennen, wat, helaas, een lastige en tijdrovende procedure is. De gevolgde methodiek voor vaststelling van de inoculumdichtheid in grond bepaalt uiteraard het resultaat. Gewoonlijk wordt grond gedroogd, gezeefd of gecentrifugeerd om uitsluitend het aantal persistente structuren (bv. sclerotiën, chlamydosporen, cysten) te bepalen, maar daar waar geen sterfte optreedt van de meer gevoelige structuren (bijv. mycelium, conidiën, larven), zoals het geval is in continue (verwarmde) kasteelt of in tropische regio's, levert selectie op basis van structuur wellicht foutieve resultaten. In de literatuur komt vaak onderzoek voor naar de relatie tussen initiële inoculumdichtheid en het optreden van plantenziekte (bijv. aantal

geïnfecteerde planten, opbrengst). Steevast komt hieruit een reeks van belangrijke factoren naar voren die dit verband beïnvloeden, zoals ras, temperatuur, bodemvochtigheid, grondsoort, management (bijv. type grondbewerking) en (elementen van) het microbiële bodemleven. Dit zijn zoveel factoren dat het moeilijk is om dit soort verbanden te extrapoleren naar de praktijk. Ook lastig is, dat in experimenten (met goede redenen) veelal behoorlijk vatbare rassen gebruikt worden en in de praktijk resistente(re) rassen. Maar hoe moeten dan kwantitatieve resultaten met die vatbare rassen worden omgezet in epidemiologische modellen die van nut zijn voor de praktijk? Voor de meeste bodempathogenen zijn er nog altijd geen zinvolle modellen die ziekte of schade kunnen voorspellen. Het is lastig, zo niet volstrekt ondoenlijk, om alle genoemde factoren in één onderzoek onder te brengen. Wellicht kunnen meta-analyses van een pathosysteem een oplossing bieden, maar het aantal onderzoeken waarin kwantitatieve effecten van omgevingsvariabelen op de relatie tussen inoculumdichtheid en bodemziekte in detail worden gepubliceerd zijn hiervoor veel te beperkt, wellicht met uitzondering van aardappelcystenaaltje. Vaak wordt wel onderzoek gedaan naar optimalisatie van biotoetsen, maar resultaten daarvan worden zelden gepubliceerd. Deze bijdrage is dan ook een oproep om zulke 'preliminar' onderzoeken juist wel te publiceren.

Ontrafelen van het mechanisme achter biologische grondontsmetting

Willemien Runia¹,
Tim Thoden¹,
Leendert Molendijk¹,
Wim van den Berg¹,
Aad Termorshuizen²,
Marta Streminska³,
André van der Wurff³,
Herman Feil⁴ &
Henk Meints⁴

¹ Wageningen UR,
Praktijkonderzoek Plant en
Omgeving, Postbus 430,
8200 AK Lelystad

² SoilCares Research
(voorheen BLGG Research),
Binnenhaven 5,
6709 PD Wageningen

³ Wageningen UR
Greenhouse Horticulture,
Postbus 20,
6708 PW Wageningen

⁴ Thatchtec BV, Agro
Business Park 10,
6708 PW Wageningen

Door nauwe vruchtwisseling en gebrek aan voldoende resistente rassen zijn problemen met bodemgebonden plant-pathogene schimmels en aaltjes nog altijd volop aanwezig. Chemische grondontsmetting is op lichte gronden redelijk effectief tegen bodemgebonden plant-parasitaire aaltjes, maar weinig of niet tegen de meeste plant-pathogene bodemschimmels. Bovendien nemen restricties in het gebruik van chemische grondontsmetting steeds meer toe. Er is daarom een duidelijke wens om te komen tot andere manieren van aanpak van bodemgebonden plantpathogenen. De niet-chemische mogelijkheden die de praktijk op dit moment tot zijn beschikking heeft zijn inundatie en biologische grondontsmetting.

Inundatie

Het onder water zetten van percelen is een beproefde methode in de bloembollenteelt om bodemziekten (zowel veroorzaakt door diverse aaltjes als door schimmels) te bestrijden. De effectiviteit hangt af van de temperatuur in combinatie met de blootstellingstijd. Daarom wordt geadviseerd inundatie in de zomer toe te passen. In de bollenteelt is het huidige advies tegen wortelknobbelaaltjes om 14 weken bij 20°C te inunderen. In de akkerbouw is gebleken dat deze methode cystenaaltjes goed kan doden. Inundatie werkt selectief tegen bepaalde aaltjes en schimmels, kan alleen worden toegepast op volledig vlakliggende percelen met een hoge grondwaterstand, en is bovendien kostbaar in de uitvoering.

Traditionele biologische grondontsmetting met vers organisch materiaal

Bij traditionele biologische grondontsmetting, ontwikkeld door Wim Blok (Wageningen Universiteit) en Jan Lamers (PPO-AGV), wordt in de zomer of nazomer 40 ton vers gras per ha door de bouwvoor gemengd, waarna de grond wordt dichtgerold en geïrrigeerd. Na afdekking met gasdicht folie wordt het gras in de grond afgebroken onder zuurstofarme (<1%) omstandigheden. Verondersteld wordt dat tijdens dit proces toxische gassen en vetzuren ontstaan die er voor zorgen dat schadelijke bodemorganismen worden gedood. Vooralsnog is de toepassing op dekzandgrond het meest betrouwbaar gebleken. In het onderzoek kon op mariene zavel alleen na het inwerken van een dubbele praktijkdosis gras en een blootstellingstermijn van 12 weken een goed resultaat tegen aardappelcystenaaltjes worden bereikt. In de praktijk is dit voor grondontsmetting

geen reële optie. *Verticillium dahliae*, veroorzaker van verwelkingsziekte, werd in de praktijk op mariene zavelgrond eveneens onvoldoende gedood. Voordeel is dat de methode relatief eenvoudig uit te voeren is, zeker op dekzandgronden, waar inundatie niet haalbaar is vanwege de grote waterdoorlaatbaarheid in combinatie met de in het algemeen lage grondwaterstand. Voorwaarde voor een goed resultaat is dat de gemiddelde etmaaltemperatuur minimaal 16°C is, wat betekent dat de grondontsmetting moet worden uitgevoerd in de (na)zomer.

Bodemresetten

Onder de naam *Bodemresetten* heeft Thatchtec B.V. te Wageningen de bovenbeschreven methode van biologische grondontsmetting verbeterd, met name wat betreft de optimalisatie van het type organische stof dat in de grond wordt gebracht. Hiertoe heeft het bedrijf diverse mengsels ontwikkeld onder de naam 'Herbie'. Daarnaast zijn onder andere het type folie, de toepassing ervan en de wijze van inbrengen van organische stof geoptimaliseerd. Sinds 2009 heeft PPO-AGV in diverse experimenten de effectiviteit van Bodemresetten bevestigd tegen juvenielen van het wortellesiaaltje *Pratylenchus penetrans*, eiproppen van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne hapla*, cysten van het aardappelcystenaaltje *Globodera pallida* en microsclerotiën van *Verticillium dahliae*. Alle toetsorganismen konden worden gedood in zowel dekzand als mariene zavel. De juvenielen van *P. penetrans* werden al gedood door de zuurstofarme omstandigheden terwijl de microsclerotiën van *V. dahliae* het moeilijkst te elimineren waren. De gasproductie bleek afhankelijk van het type en de dosering van het organische product, blootstellingstijd, grondsoort en temperatuur. Ook de eenmalig gemeten vetzuurproductie bleek afhankelijk van het toegepaste product.

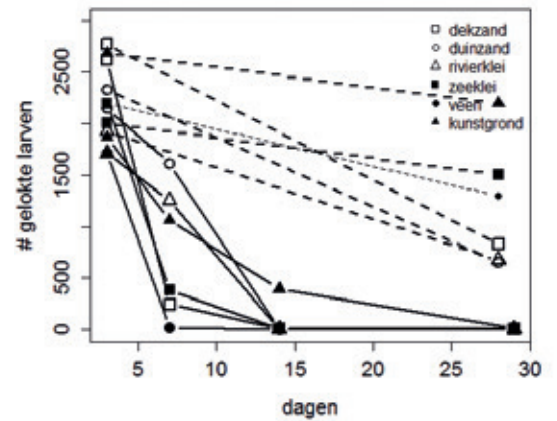
In een gezamenlijk project van PPO-AGV, WUR-glas, SoilCares Research (voorheen BLGG Research) en Thatchtec B.V., gefinancierd door de provincie Gelderland met het Europese Fonds voor Regionale Ontwikkeling (EFRO), is het Bodemresetten verder onderzocht. Doel was het dodingsmechanisme te ontrafelen, waardoor een verdere optimalisatie van Bodemresetten zou kunnen plaatsvinden. In een incubatie-experiment in emmers van 11 L zijn vijf Nederlandse grondsoorten en een kunstgrond onderzocht op het dodingseffect van 'Herbie 22' in een dosering van 4 g ruw eiwit/L grond tegen het aardappelcystenaaltje (*G. pallida*) bij 20°C.



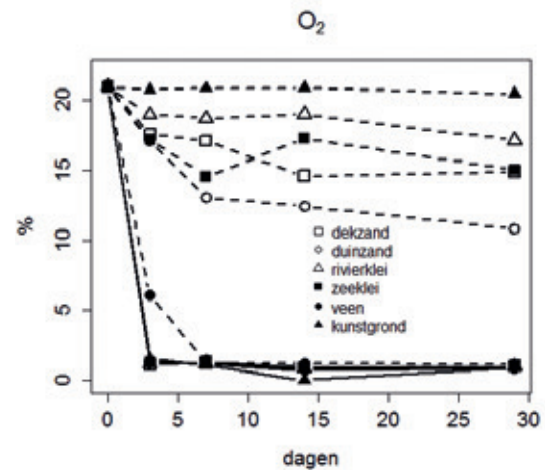
Figuur 1. Vele handen maken licht werk bij de inzet van het experiment.

spectrum van grondsoorten praktisch volledige doding van *G. pallida* optrad. De variatie in dodingssnelheid tussen grondsoorten roept de vraag op welke verschillen er bestaan tussen de beide groepen gronden. Deze twee groepen gronden bleken te verschillen in hoeveelheden organische stof, N-totaal, N-NH₄ en P-totaal en het aantal flagellaten en amoeben in de grond voorafgaand aan de 'Herbie'-toepassing. Deze waren hoger bij de gronden met snelle doding. Kortom: in 'rijkere' gronden trad makkelijker/snelere doding op dan in 'armere' gronden.

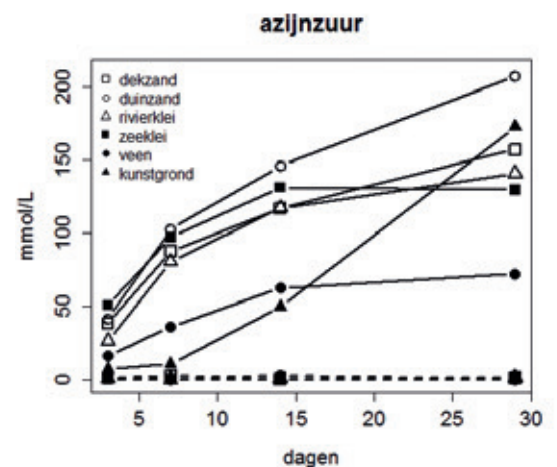
De zuurstofconcentraties in de afgesloten controle-emmers (d.w.z. zonder 'Herbie') namen volgens verwachting af in de tijd door microbiële activiteit (Figuur 3). De mate waarin de O₂-concentraties afnamen was gerelateerd aan het organische-stofgehalte. Zo is in de kunstgrond, die geen organische stof bevat, geen afname van O₂ gemeten, maar in de veengrond met 11% organische stof was de O₂-concentratie 1,1% na 28 dagen. Na 'Herbie'-toepassing daalde de O₂-concentratie in alle gronden zeer snel tot <1,3% vanaf dag 3. Conform verwachting gedroegen de CO₂-concentraties zich omgekeerd aan de O₂-concentraties. Lachgas (N₂O), ammoniak (NH₃), zwavelwaterstof (H₂S) en methaan (CH₄) werden alleen gemeten in de behandeling met 'Herbie', maar de variaties waren groot en tijd- en grondsoortafhankelijk; een relatie met doding van *G. pallida* kon niet worden gelegd. Vetzuren werden niet of nauwelijks gemeten in de onbehandelde, afgesloten gronden. In de met 'Herbie' behandelde gronden nam de concentratie vetzuren toe in de tijd (Figuur 4). Na 28 dagen was de concentratie azijnzuur in de grond het hoogste (>60 mmol/L; Figuur 4), gevolgd door propionzuur (10-35 mmol/L) en boterzuur (20-50 mmol/L). De geproduceerde vetzuren bleken goed te correleren met de doding van *G. pallida*: 99,5% doding bij een vetzuurproductie van >100 mmol/L azijnzuur, >10 mmol/L propionzuur en >30 mmol/L boter-



Figuur 2. Het aantal gelokte juvenielen van *Globodera pallida* als functie van tijd in 6 gronden geïncubeerd bij 20°C in gesloten 11-L emmers gevuld met 8 L grond met (ononderbroken lijnen) of zonder (onderbroken lijnen) toevoegingen van "Herbie".



Figuur 3. Concentratie van zuurstof als functie van tijd in emmers gevuld met 8 L grond en geïncubeerd bij 20°C in gesloten 11-L emmers aangevuld met (ononderbroken lijnen) of zonder (onderbroken lijnen) toevoegingen van "Herbie".



Figuur 4. Concentratie van azijnzuur in grondextracten als functie van tijd van 6 gronden geïncubeerd bij 20°C in gesloten 11-L emmers gevuld met 8 L grond met (ononderbroken lijnen) of zonder (onderbroken lijnen) toevoegingen van "Herbie".

zuur. Deze correlaties waren goed als de totale hoeveelheden vetzuur gebruikt werden, hoewel bekend is dat vetzuren alleen toxisch zijn in hun ongedissocieerde vorm. Deze ongedissocieerde vorm komt alleen voor bij lagere pH-waarden (beneden ongeveer pH 5,5), en dit stemt niet overeen met de pH-waarden die we gemeten hebben in de bulkgrond: deze varieerden tussen 4,9 en 7,6, en waren na behandeling gedaald met ongeveer 0,5-eenheid. Wellicht varieert de pH in de bodem op microniveau, waarbij de correlatie tussen effectiviteit van vetzuren en pH wel bestaat maar niet tot uiting komt in de bulk-pH.

Tussen 14 en 28 dagen bleek het aantal vrijlevende niet-parasitaire nematoden afgenomen met meer dan 50% in de met 'Herbie' behandelde gronden,

terwijl de aantallen in de niet met 'Herbie' behandelde gronden gelijk bleven. Ten opzichte van het totaal aantal bacteriën steeg het aandeel *Firmicutes* in diverse met 'Herbie' behandelde gronden gedurende de eerste 14 dagen.

Uit de resultaten concluderen we dat doding van *G. pallida* met meer dan 99,5% goed kan worden voorspeld aan de hand van een O_2 -concentratie <1,1% en het totaal aantal nematoden (incl. niet-plantenparasitaire) <150 per 100 gram grond. Deze zouden dus mogelijk als indicator kunnen dienen voor het succes van Bodemresetten. Het tijdstip van bemonstering is dan wel van belang, want aanvullende waarnemingen gaven aan dat het totaal aantal aaltjes snel weer toeneemt als de O_2 -concentratie weer toeneemt.

Samenvattend:

- Het mechanisme van Bodemresetten duidt op toxische werking van vetzuren die tijdens de vergisting van 'Herbie' ontstaan. De waarnemingen zijn evenwel niet in overeenstemming met de gemeten waarden van de bulk-pH van de grond.
- Het lijkt erop dat de gemeten gassen geen verklaring geven voor de doding van *G. pallida*.
- Het proces van Bodemresetten kan worden gemonitord door het volgen van de O_2 -concentratie en het totale aantal nematoden.
- 'Rijke' gronden (hoge gehalten aan organische stof en totaal-N) hebben een grotere kans op succes en snelle afdoding dan 'arme' gronden. 'Arme' gronden hebben dus wellicht meer 'Herbie' nodig, en/of een langere incubatietijd, dan 'rijke' gronden.



5th conference
of the International Working Group
on Legume and Vegetable Viruses

30 August - 3 September 2015, Haarlem, The Netherlands