



Bodemgezondheidproef 2017-2020

Langjarig onderzoek naar het effect van verschillende maatregelen en teeltsystemen op het bodemmicrobioom en ziektevering

Auteurs | Viola Kurm, Johnny Visser, Joeke Postma en Gerard Korthals

Wageningen, maart 2022



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



Bodemgezondheidproef 2017-2020

Langjarig onderzoek naar het effect van verschillende maatregelen en teeltsystemen op het bodemmicrobioom en ziektevering

Auteurs

Viola Kurm¹, Johnny Visser², Joeke Postma¹ en Gerard Korthals¹

1 Wageningen University & Research | Biointeracties & Plantgezondheid

2 Wageningen University & Research | Open teelten



Dit onderzoek is in opdracht van Topsector Agri & Food uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), in het kader van de PPS Beter Bodembeheer (TKI-AF-16064/BO-56-001-005 & LWV2042/BO-56-001-061) en het KB-33 programma "Towards a circular climate positive today society" (KB-33-006-005).

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, maart 2022

V. Kurm, J. Visser, J. Postma, G.W. Korthals, 2022. Langjarig onderzoek naar het effect van verschillende maatregelen en teeltsystemen op het bodemmicrobioom en ziektevering. Wageningen Research.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/564744>

Trefwoorden: biologisch teeltsysteem; gangbaar teeltsysteem; gewasopbrengst; groenbemester; organische restmaterialen; grondontsmetting; ziektevering; PLFA; bodemmicrobioom

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Biointeracties en Plantgezondheid, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Projectnummer 3750354205

Foto omslag: Biotoetsen, Mirjam Schilder



Deelnemende partijen: Topsector Agri & Food, BO-Akkerbouw, LTO Nederland, ZLTO, LLTB, LLTB/Arvalis, LTO Noord, Agrifirm NWE B.V., Cosun Beet Company, IRS, CZAV/Crop Solutions, AVEBE, Van Iperen, BVOR, Vereniging Afvalbedrijven, Biohuis, CAV Agrotheek, Kairos, Rabobank, ASR real estate, Vitens N.V., Van Tafel naar Kavel, SPNA, NMI, Eurofins, Agrocarea/HLB, Imants, Delphy.

Inhoud

Woord vooraf	5
Samenvatting	7
1 Inleiding	9
1.1 Aanleiding	9
1.2 Achtergrond van de bodemmaatregelen	9
1.2.1 Groenbemesters	10
1.2.2 Organische restmaterialen	11
1.2.3 Ontsmetten	11
1.3 Rol van het microbioom	12
1.4 Doelstelling project	12
2 Opzet en uitvoering	15
2.1 Gewasrotatie	15
2.3 Maatregelen	16
2.4 Bemesting	18
2.5 Metingen en bemonsteringen	19
2.5.1 Bodemmicrobioom	19
2.5.2 Biotoetsen	20
2.5.3 PLFA	20
2.5.4 Microbiële biomassa	21
2.5.5 HWC en PMN	21
2.5.6 Bodemrespiratie en Microresp	21
2.6 Statistische verwerking	21
3 Resultaten	22
3.1 Bodemmicrobioom	22
3.1.1 Diversiteit	22
3.1.2 Schimmel- en bacteriegemeenschap	23
3.1.3 Differentiële abundantie	27
3.1.4 Abundantie schimmel- en bacterie DNA	32
3.2 Biotoetsen	34
3.2.1 Rhizoctonia 2018	34
3.2.2 Rhizoctonia 2019	35
3.2.3 Pythium 2018 en 2019	37
3.3 PLFA	38
3.4 Microbiële biomassa	43
3.5 HWC en PMN	44
3.6 Bodemrespiratie en Microresp	46
3.7 Bodemvruchtbaarheidsdata	50
4 Discussie en Conclusies	52
4.1 Microbioom (November 2018)	52
4.2 Biotoetsen (November 2018 en 2019)	53
4.3 PLFAs (Maart 2020)	53
4.4 Microbiële biomassa (Maart 2020)	54
4.5 HWC en PMN (Maart 2019 en 2020)	54
4.6 Bodemrespiratie en Microresp (Maart 2020)	54

4.7	Algemene discussie	55
4.8	Conclusie	55

Literatuur 56

Bijlage 1

Woord vooraf

De Bodemgezondheidsproef is opgezet in 2006 om veel verschillende bodemmaatregelen te toetsen op hun effectiviteit om het wortelziekteaaltje *Pratylenchus penetrans* en de bodemschimmel *Verticillium dahliae* te beheersen in een akkerbouwsysteem op zandgrond. De veldproef is aangelegd als een gewarde blokkenproef waarin alle maatregelen zowel in een biologisch als in een gangbaar akkerbouwsysteem zijn aangelegd. Daarnaast is de proef gebruikt om de invloed van de maatregelen te onderzoeken op bodemweerbaarheid en het bodemleven. Dat onderzoek werd gefinancierd door Brancheorganisatie Akkerbouw en het ministerie van LNV. De PPS Beter Bodembeheer (projectnummers TKI-AF-16064/ BO-56-001-005 en LWV2042/BO-56-001-061, werkpakket 2a) maakte het mogelijk om het onderzoek voort te zetten en langetermijneffecten te meten. De financiers van deze projecten zijn Topsector Agri & Food, BO-Akkerbouw, LTO Nederland, ZLTO, LLTB, LLTB/Arvalis, LTO Noord, Agrifirm NWE B.V., Cosun Beet Company, IRS, CZAV/Crop Solutions, AVEBE, Van Iperen, BVOR, Vereniging Afvalbedrijven, Biohuis, CAV Agrotheek, Kairos, Rabobank, ASR real estate, Vitens N.V., Van Tafel naar Kavel, SPNA, NMI, Eurofins, Agrocares/HLB, Imants en Delphy. De resultaten van het microbiologisch onderzoek in 2018-2020 zijn beschreven in het huidige rapport. De microbiom analyses in 2019 zijn uitgevoerd met financiering van het KB-33 programma 'Towards a circular climate positive society' met projectnummer KB-33-006-005 ('Microbioom Plant' - Sturing microbiom voor betere veerkracht in planten).



Samenvatting

In een lang termijn veldproef sinds 2006, zijn in 2018 10 verschillende bodemmaatregelen uitgevoerd in zowel een gangbaar als een biologisch landbouwsysteem. De maatregelen waren zwarte braak (CTR), teelt van gras/klaver (GRK), teelt van *Tagetes patula* (TAG), teelt van een groenbemestermengsel (MIX), compost (CMP), chitine (CHI), haarmeel (HRM), anaerobe grondontsmetting (ASD), grondontsmetting (ONT: NGO of CAL) en een combinatie van anaerobe grondontsmetting, haarmeel en compost (AHC). Vervolgens werden op verschillende tijdstippen in 2018, 2019 en 2020 een aantal microbiologische en bodembioologische parameters gemeten.

In 2018 is het bodemmicrobioom geanalyseerd, i.e. de samenstelling van de bacteriële en schimmelgemeenschap in de bodem. In vergelijking met de controle was de diversiteit van beide groepen verlaagd in de diverse ontsmettingsbehandelingen. Ook verschilde de samenstelling van de microbiële gemeenschappen duidelijk tussen de ontsmettingsbehandelingen en de overige behandelingen. Wel was de DNA concentratie van zowel schimmels als bacteriën vaak hoger in met name de anaerobe grond ontsmetting (ASD) en de combi (AHC) behandeling. Het biologische en gangbare landbouwsysteem verschilden weinig van elkaar.

In zowel 2018 als 2019 zijn biotoetsen uitgevoerd om de weerbaarheid van de grond tegen *Rhizoctonia solani* en *Pythium ultimum* te meten. Voor *R. solani* was de ziekteincidentie in alle behandelingen hoog en er is dus nauwelijks weerbaarheid gemeten. Voor *P. ultimum* daarentegen was de weerbaarheid in beide jaren duidelijk hoger in de AHC behandeling dan in de andere behandelingen.

In 2020 is het microbiom middels PLFA analyse onderzocht in de CTR, CMP en AHC behandelingen. Hierbij waren veel parameters, zoals de microbiële biomassa, het aantal bacteriën en schimmels en mycorrhiza verhoogd in het biologische landbouwsysteem vergeleken met het gangbare systeem. De meeste parameters waren het hoogst in de combi behandelingen, wat duidt op hogere biomassa en activiteit van het microbiom.

De schimmel en bacterie biomassa werd tegelijkertijd ook met klassieke microscopische methoden in kaart gebracht. Deze toonden geen correlatie met de PLFA metingen en er waren geen significante verschillen tussen de landbouwsystemen en behandelingen.

HWC (heet-water extraheerbare koolstof) is in 2019 gemeten in alle behandelingen, met significant hogere waarden in de combi behandeling en de anaerobe grond ontsmetting. Dit komt overeen met de hogere microbiële biomassa en hogere concentratie van schimmel- en bacterie DNA. Ook de MIX, CMP en CHI behandelingen bevatten meer HWC dan de controle. In 2020 waren zowel HWC als PMN (potentieel mineraliseerbare stikstof) het hoogst in de AHC behandeling.

In 2020 is in de controle, compost en combi behandelingen bodemrespiratie gemeten en het vermogen van de microbiële gemeenschap om verschillende organische stoffen te mineraliseren (i.e. Microresp). Respiratie was verhoogd in de AHC behandeling. Voor de Microresp analyse is geen duidelijk patroon van verschillen tussen de behandelingen waargenomen.

Alle metingen tonen een sterk effect van de combinatie behandeling op het bodemmicrobioom, wat een van de meest ingrijpende behandelingen voorstelde. De meeste veranderingen waren positief, zoals verhoogde weerbaarheid tegen *P. ultimum* en een verhoogde microbiële biomassa en activiteit. Maar ook andere behandelingen, zoals compost en anaerobe grondontsmetting lieten effecten zien op het microbiom. De verschillen tussen het biologische en gangbare landbouwsysteem waren doorgaans minder groot.



1 Inleiding

1.1 Aanleiding

De land- en tuinbouw ontwikkelen zich naar intensievere en complexere bedrijfssystemen, waarbij een steeds groter wordend beroep wordt gedaan op de bodemgezondheid. Keuzes die de teler maakt, moeten gericht zijn op zo min mogelijk schade door verschillende bodempathogenen, zoals aaltjes, schimmels en bacteriën. Dit moet bovendien passen binnen zeer strenge eisen aan inzet van gewasbeschermingsmiddelen en bemesting. Daarnaast zal de beschikbaarheid van gewasbeschermingsmiddelen de komende jaren verder afnemen en is er ook vanuit maatschappelijk en milieuoogpunt de noodzaak om afhankelijkheid en gebruik hiervan verder terug te dringen. Daardoor moeten ziekten en plagen via alternatieve maatregelen beheerst of voorkómen worden. Bodemweerbaarheid en de balans tussen positieve en negatieve bodemorganismen spelen hierbij een steeds belangrijker rol. Deze trend vergt nieuwe kennis over de inpasbaarheid en bedrijfszekerheid van teeltmaatregelen om de bodemgezondheid te optimaliseren. Naast het leveren van een duurzame en rendabele productie, is het bodembeheer steeds belangrijker om andere (ecologische) functies (ecosysteemdiensten) van de bodem te vervullen, zoals het voorkomen van emissies en behoud van biodiversiteit.

Dit type onderzoek vereist een integrale aanpak, waarbij verschillende strategieën om de bodem te beheren, op zowel chemisch, fysische en biologische aspecten langdurig worden onderzocht.

In 2006 is het project "Ontwikkelen maatregelen en meettechnieken ten bate van bodemgezondheid" gestart met de aanleg van de langjarige veldproef (de 'Bodemgezondheidproef', BDGZ) op proefboerderij Vredepeel. Doel van het project is het ontwikkelen van maatregelen voor het duurzaam verbeteren van bodemkwaliteit in geïntegreerde (gangbare) en biologische teeltsystemen en het ontwikkelen van indicatoren waarmee bodemkwaliteit kan worden gemeten en waar adviezen op kunnen worden gebaseerd.

De systeemproof Bodemgezondheid is aangelegd op een perceel dat typerend is voor lichte (zand)gronden. Het perceel is besmet met verschillende bodempathogenen zoals plant parasitaire aaltjes en schadelijke bodemschimmels. Bij de start van de proef zijn biologische en gangbare teeltsystemen aangelegd. De biologische systemen worden beheerd met organische mest en zonder chemische gewasbescherming, de geïntegreerde systemen met inzet van kunstmest en gewasbeschermingsmiddelen. De teelt in het biologische systeem voldoet sinds het begin in voorjaar 2006 aan SKAL richtlijnen. De proef is aangelegd als een split-plot blokkenproef in vier herhalingen (blokken) zodat de resultaten statistisch geanalyseerd kunnen worden. Binnen elk van de vier blokken zijn de vier teeltsystemen geward over vier plots. Binnen iedere plot liggen tien subplots waarover tien behandelingen zijn geward. Dit betekent dat geïntegreerde en biologische systemen (geward) op één perceel zijn aangelegd in een statistisch robuuste opzet.

1.2 Achtergrond van de bodemmaatregelen

In deze systemen zijn tien verschillende bodemmaatregelen uitgevoerd, die gericht zijn op het (duurzaam) onderdrukken van pathogenen, het verhogen van bodemweerbaarheid en stimuleren van bodemleven. De bodemmaatregelen zijn in te delen in verschillende types: telen van groenbemesters, toedienen van organische restmaterialen en verschillende manieren van grondontsmetten. De bodemmaatregelen die zijn uitgevoerd zijn in de loop van de tijd iets aangepast (Tabel 1.1, Bijlage 1). Omdat biofumigatie met de gebruikte methode niet effectief is gebleken, is de teelt van het biofumigatiegewas Sarepta mosterd vervangen door de teelt van een groenbemestermengsel. Deze vaak complexe mengsels van verschillende groenbemesters staan de laatste jaren sterk in de belangstelling, maar effecten op de bodem zijn nog onvoldoende bekend. De machine die eerder werd

gebruikt voor fysische grondontsmetting, waarbij de grond verhit wordt tot circa 700°C, is in Nederland niet meer beschikbaar. Deze behandeling is vervangen door haarmeel, omdat er belangstelling is voor keratinehoudende producten met mogelijk stimulerend effect op bodemweerbaarheid. In de combinatiebehandeling is de teelt van *Tagetes* vervangen door Anaerobe grondontsmetting ('Anaerobic Soil Disinfestation': ASD), omdat de teelt van *Tagetes* een zeer sterk effect heeft op de besmetting met het wortellesieaaltje en daarmee op opbrengst en kwaliteit. Het effect van de aanvullende maatregelen was daarmee moeilijk te bepalen.

Tabel 1.1 Overzicht van de toegepaste bodemmaatregelen in de Bodemgezondheidproef in 2006, 2009 en 2018.

	Maatregelen jaar 2006 en 2009	Maatregelen jaar 2018
1	Onbehandeld (zwarte braak)	Onbehandeld (zwarte braak)
2	Gras-klaver	Gras-klaver
3	<i>Tagetes patula</i> (Afrikaantje)	<i>Tagetes patula</i> (Afrikaantje)
4	Biofumigatie (Sarepta mosterd)	Groenbemestermengsel
5	Compost	Compost
6	Chitine	Chitine
7	Fysische grondontsmetting (Cultivit)	Haarmeel
8	Anaerobe grondontsmetting (ASD)	Anaerobe grondontsmetting (ASD)
9	Chemische/biologische ontsmetting	Chemische/biologische ontsmetting
10	Combinatie (<i>Tagetes</i> , chitine, compost)	Combinatie (ASD, haarmeel, compost)

Er zijn verschillende redenen om voor bepaalde bodemmaatregelen te kiezen. Hieronder volgt een beschrijving van de achterliggende gedachten bij de drie groepen maatregelen die zijn geselecteerd en die in de zomer van 2018, na de teelt van conservenerwten, zijn uitgevoerd. In hoofdstuk 2 volgt een beschrijving van de uitvoering van de maatregelen in de proef.

1.2.1 Groenbemesters

Voor de teelt van groenbemesters wordt vaak bewust gekozen vanwege de positieve effecten op de bodem die aan de teelt van deze gewassen wordt toegeschreven. De groenbemesters leggen verschillende nutriënten vast, leveren organische stof en hebben een positief effect op de bodemstructuur. Stikstofbindende gewassen zoals klavers worden geteeld om extra stikstof (N) in de grond te brengen. Groenbemesters kunnen echter ook waardplant zijn voor bodemorganismen, zoals plant parasitaire aaltjes of (mycorrhiza)schimmels. Hierdoor zal het netto resultaat (positief of negatief) afhangen van verschillende factoren, zoals het aanwezige bodemleven en de gewasrotatie.

In een mengsel van verschillende groenbemesters kunnen de positieve eigenschappen van afzonderlijke groenbemesters worden gecombineerd. De verschillende soorten in een mengsel vullen elkaar aan op aspecten als opkomst, groei en bodembedekking, effect op bodemstructuur en het vastleggen en weer beschikbaar komen van nutriënten. Echter ook de negatieve eigenschappen van de afzonderlijke groenbemesters, zoals de vermeerdering van plant parasitaire aaltjes, moeten bij de teelt van mengsels worden onderzocht.

Tagetes patula wordt vooral geteeld ter bestrijding van het wortellesieaaltje. Het is bekend dat wortellesieaaltjes door aanprikken en binnendringen van de wortels van *T. patula* actief gedood kunnen worden. In de endodermis van *Tagetes* komt de stof α -terthienyl voor, die kan worden omgezet in een voor aaltjes dodelijke stof (Bakker *et al.*, 1979). Alleen aaltjes die doordringen tot de endodermis zetten dit omzettingsproces in gang. De teelt van *Tagetes* is daarom niet tegen alle aaltjes effectief. Met betrekking tot andere gevolgen voor het bodemleven is echter zeer weinig bekend. *Tagetes*-soorten verschillen in de mate van dodelijke werking tegen *Pratylenchus penetrans*. *Tagetes minuta* en *T. erecta* werken minder effectief tegen *Pratylenchus penetrans* dan *T. patula*. (Molendijk & Rovers, 1996). De werking van het effect van de teelt van *Tagetes* op het populatieniveau van *P. penetrans* is langduriger dan van een chemische grondontsmetting (Evenhuis *et al.*, 2004). Voor een maximale bestrijding van *Pratylenchus*-aaltjes dient het gewas in de zomer te worden geteeld, met een teeltduur van minimaal 3 maanden. De meest optimale zaaiperiode ligt tussen half mei tot uiterlijk half juli.

1.2.2 Organische restmaterialen

In de literatuur wordt in het algemeen een neutraal of positief effect gemeld van organische toevoegingen op bodemgezondheid, met een remmend effect op bacterie- en schimmelziekten (zie o.a. Termorshuizen et al., 2006). Door toediening van compost wordt geprobeerd om factoren zoals de bodemstructuur, de organische stof voorraad en het leefmilieu van het bodemleven te verbeteren (Blok et al., 2000). Daarnaast is vanuit onderzoek bekend dat compost signalen van de plant (zoals wortellexudaten) naar aaltjes zou kunnen verstoren, zodat de aaltjes de plant minder belagen (Hartsema et al., 2005).

Zowel van chitine- als keratinehoudende restmaterialen worden genoemd dat ze bodemweerbaarheid zouden kunnen verhogen. Afval van garnalen bevat een hoog gehalte van het stikstofhoudende polysaccharide chitine, dat chemisch gezien verwant is aan cellulose. Bij de omzetting van chitinehoudende producten in de bodem ontstaat o.a. ammoniak, wat kan leiden tot directe doding van bodemorganismen zoals aaltjes en schimmels (Schippers & Palm, 1973). Daarnaast reageren de in de bodem aanwezige chitinolytische micro-organismen, die de chitine afbreken (Gooday, 1990). Er is weinig bekend over de effecten van eventuele omzettingproducten. Het is ook onbekend of diezelfde chitinolytische organismen ook andere bodemorganismen, zoals aaltjes en aaltjeseieren die ook chitine bevatten, zullen gebruiken als substraat.

Keratine is een taai, vezelig eiwit met een hoog gehalte aan zwavelhoudende aminozuren. Net als chitine is ook keratine een complexe stof, die (deels) door dezelfde organismen kan worden afgebroken (Calin et al., 2019). Het bodemleven reageert op de toevoeging van haarmeel, dat een hoog gehalte aan keratine bevat. In biotoetsen kon de bodemweerbaarheid worden verhoogd door haarmeel aan de bodem toe te voegen (Postma et al., 2020).

1.2.3 Ontsmetten

Er zijn verschillende manieren om grond vrij te maken van ziekteverwekkers en plagen. Bij biologische of anaerobe grondontsmetting (Anaerobic Soil Disinfestation; ASD) wordt minimaal 40 ton vers organisch materiaal per ha bouwvoor diep (tot 30 cm) ingewerkt. Vervolgens wordt de grond afgedicht met een gasdicht folie. Het geheel moet vervolgens minimaal 6-10 weken bij voldoende hoge bodemtemperatuur (>16 °C) afgedicht blijven, afhankelijk van de te bestrijden organismen. Aangezien de bodemtemperatuur in de meeste jaren vanaf eind september sterk gaat dalen, zal biologische grondontsmetting in de tweede helft van juli (uiterlijk 1 augustus) aangelegd moeten worden om lang genoeg werkzaam te zijn bij voldoende hoge bodemtemperatuur (Meijer & Lamers, 2004). Bij de (anaerobe) omzetting van het organische materiaal ontstaan verschillende afbraakproducten en wordt zuurstof onttrokken, waardoor de samenstelling van het bodemleven verandert (Lamers, 2004). Dit heeft een dodend effect op meerdere soorten bodemziekten, aaltjes en onkruiden (Termorshuizen et al., 2020). Mogelijk heeft toedienen van organische materialen na afloop van ASD een stimulerend effect op het bodemleven. Dit lijkt een dure oplossing, maar het is voorstelbaar dat de verschillende maatregelen elkaar aanvullen, waardoor er een sterker of duurzamer effect is op de bodemgezondheid (Korthals et al., 2014).

Het uitvoeren van een chemische grondontsmetting (NGO) om bodempathogenen als aaltjes en schimmels, maar ook (wortel)onkruiden te bestrijden is in de land- en tuinbouw vrij gangbaar. Door een goed uitgevoerde natte grondontsmetting kan een aaltjesbesmetting met circa 85% afnemen. Op dit moment (mei 2021) is voor het uitvoeren van een Natte Grondontsmetting (NGO) alleen het middel Monam toegelaten. De actieve stof van Monam is metam-natrium, dat in de bodem ontbindt in het voor veel bodemorganismen toxische methylisothiocyanaat (MIT). Monam wordt met een spitinjecteur bouwvoordiep ingebracht, waarna de grond dichtgerold wordt. Sinds 2018 is de teler verplicht de bodem vervolgens af te dekken met folie (Ctgb, wijziging toelating 23-2-2018). Grondsoort, vochtigheid van de bodem, bodemtemperatuur en toepassingsmethodiek zijn bepalende factoren voor effectiviteit. Kleigronden zwaarder dan 35% afslibbaar zijn niet geschikt voor toepassing vanwege de structuur, die ook een goede afdichting na toepassing van Monam belemmert.

Binnen de biologische teelt is de inzet van synthetische chemie niet toegelaten. In het biologische bedrijfssysteem is de grondontsmetting daarom uitgevoerd met Terrafit (zaadmeel), een natuurlijk

product gebaseerd op mosterdzaad (*Brassica juncea*). De inhoudsstof van dit product is verwant aan de werkzame stof van het chemische grondontsmettingsmiddel Monam.

1.3 Rol van het microbioom

Er is steeds meer aandacht voor de rol van het microbioom, de microbiële gemeenschap, bij het behouden en verbeteren van de bodemgezondheid. Bacteriën en schimmels in de grond zijn betrokken bij uiteenlopende bodemfuncties, zoals decompositie en bodemvruchtbaarheid, bodemstructuur en waterhuishouding en verbetering van de plantengroei. Tegelijkertijd zijn sommige bacterie- en schimmelsoorten ziekteverwekkers die bestreden kunnen worden door een gezond en gevarieerd microbioom dat overmatige groei van schadelijke pathogenen tegengaat.

Meerdere microbiologische parameters kunnen worden gemeten als belangrijke indicatoren voor de bodemgezondheid, zoals microbiële biomassa, activiteit, diversiteit en de samenstelling van de microbiële gemeenschap, oftewel de aan- en afwezigheid en specifieke abundantie van verschillende soorten. Hogere microbiële biomassa en activiteit zijn indicatoren voor een snellere afbraak en vervolgens een hogere beschikbaarheid van voedingsstoffen voor planten (Dalal, 1998). Tegelijk kan een actief bodemleven bijdragen aan weerbaarheid (Stockdale and Brookes, 2006). Een grote diversiteit van bacteriën en schimmels is vaak gecorreleerd met een betere afbraak van organische stof door de aanwezigheid van gespecialiseerde soorten, resistentie tegenover schommelingen in omgevingsfactoren en weerbaarheid tegen ziektes. Maar ook de aanwezigheid van specifieke soorten kan grote invloed hebben op de bestrijding van ziekteverwekkers of gespecialiseerde bodemfuncties.

Weerbaarheid tegen grondgebonden ziektes wordt steeds belangrijker als klassieke bestrijdingsmiddelen wegvallen. Weerbaarheid in de grond is vaak een combinatie van twee verschillende mechanismen, generalistische weerbaarheid en specifieke weerbaarheid. Generalistische weerbaarheid is gebaseerd op de activiteit van een groot aantal verschillende micro-organismen die met de ziekteverwekker concurreren om ruimte en voedingsstoffen (Mazzola, 2002). Meerdere ziekteverwekkers, zoals *Pythium ultimum*, veroorzaker van de omvalziekte, zijn gevoelig tegenover deze vorm van weerbaarheid (Bongiorno, et al., 2019). Specifieke weerbaarheid daarentegen, wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van bepaalde schimmel- of bacteriesoorten die een antagonistische werking hebben tegen de ziekteverwekker. De schimmel *Rhizoctonia solani* lijkt vooral gevoelig te zijn voor deze vorm van ziekteverweering.

Van veel bodemmaatregelen is bekend dat ze invloed kunnen hebben op het bodemmicrobiom. Zo verhogen de toevoeging van chitine en keratine de aanwezigheid van chitinolytische micro-organismen (Andreo-Jimenez, et al., 2021). Ook verschillende groenbemesters kunnen de samenstelling van het microbiom veranderen door het afgeven van verschillende secundaire metabolieten (Finney, et al., 2017) of door symbiose met specifieke micro-organismen, bijvoorbeeld stikstof bindende bacteriën. Ontsmettings-maatregelen leiden doorgaans tot het afsterven van een aantal ziekteverwekkers, maar ook van een deel van onschadelijke micro-organismen en tot een verandering in de samenstelling van de microbiële gemeenschap, welke op zijn beurt een positief effect kan hebben op plantengroei en ziekteverweering (Mazzola, et al., 2018).

1.4 Doelstelling project

Doelstelling van het project is om bij te dragen aan het ontwikkelen van praktisch toepasbare maatregelen om de bodemkwaliteit (bodemgezondheid en -weerbaarheid) duurzaam te verbeteren in biologische en geïntegreerde teeltsystemen op zand. Een tweede doel is een bijdrage te leveren aan het ontwikkelen van methoden (parameters/indicatoren) om de bodemkwaliteit te meten en adviezen te geven.

De maatregelen zijn gericht op:

-
- Bestrijding van schadelijke bodempathogenen; welke (niet-chemische) maatregelen zijn effectief en duurzaam om schadelijke bodemorganismen te bestrijden en wat is de impact van deze maatregelen op de bodemweerbaarheid en het bodemleven.
 - Bodembioogie en bodemweerbaarheid; welke maatregelen zijn effectief om het bodemleven en de bodemweerbaarheid duurzaam te veranderen. Het bodemleven is een bepalende factor in het functioneren van de bodem en voor de gewasproductie.
 - Organisch stofbeheer; effect van organische stof toepassingen (samenstelling en hoeveelheid) op bodemweerbaarheid, bodemleven en andere bodemdiensten.

De contrasten in deze proef, die zijn ontstaan vanuit de historie en/of door de nieuw uit te voeren maatregelen, worden ook gebruikt voor (bodem)onderzoek door derden (o.a. NIOO-KNAW, vakgroepen WUR, RUG, RIVM) en in andere werkpakketten binnen de PPS Beter BodemBeheer (o.a. werkpakket 3: Nuttig bodemleven en beheersing bodempathogenen, werkpakket 1: Organische stof en bemesting en werkpakket 8: Meten van Bodemkwaliteit en ecosysteemdiensten).

Resultaten van de periode 2006-2016 zijn via diverse media (o.a. via vakbladartikelen, nieuwsberichten, internet (www.BeterBodemBeheer) flyers, open dagen, lezingen en wetenschappelijke publicaties) gecommuniceerd. In dit rapport wordt het effect van de maatregelen en teeltsystemen op het bodemmicrobioom en ziektevering in de periode 2017-2020 beschreven.

In aanvullende rapportages zullen de effecten van de maatregelen en teeltsystemen op andere bodembioologische parameters zoals milieuaaltjes, de bodemvruchtbaarheid en de gewasproductie worden beschreven.



2 Opzet en uitvoering

De bodemgezondheidproef is in 2006 aangelegd als een split-plot blokken proef in vier herhalingen. De teeltsystemen biologisch en gangbaar zijn geward op de hoofdplots aangelegd en de tien behandelingen geward op de subplots (zie bijlage 2; proefveldschema). De teeltsystemen zijn aangelegd in stroken van 6 × 60 m. Elke strook is opgedeeld in 10 plots van 6 × 6 m waarop de verschillende bodemmaatregelen zijn uitgevoerd.

De teelt in het biologische systeem is uitgevoerd volgens de SKAL richtlijnen voor biologische teelten. De gangbare praktijk op de dekzandgronden in de regio zuidoost Nederland is als uitgangspunt voor het gangbare systeem genomen.

2.1 Gewasrotatie

In de periode 2006 tot en met 2016 zijn achtereenvolgens de volgende gewassen geteeld: graan (+ maatregelen), aardappelen, lelie, graan (+ maatregelen), aardappel, B-peen, maïs (2012, 2013, 2014), conservenerwten en graan (bijlage 3). Na een aantal "rustjaren" waarin geen maatregelen zijn uitgevoerd, zijn in 2017 aardappelen geteeld. Dit gewas is gevoelig voor een aantal belangrijke bodempathogenen die in het perceel aanwezig zijn. De teelt van dit gewas geeft inzicht in effecten van de teeltsystemen en mogelijke duureffecten van bodemmaatregelen die in periode 2006-2016 zijn uitgevoerd. Bovendien geeft dit een indicatie van de uitgangssituatie voor de voortzetting van de proef in de daaropvolgende jaren.

In tabel 2.1 is de rotatie van de hoofdgewassen en groenbemesters vanaf 2017 weergegeven. In 2017 zijn consumptieaardappelen geteeld. Na de aardappelteelt is, op 7 september, Japanse haver (Pratex) als groenbemester gezaaid. De groenbemester is half december geklepeld en licht ingewerkt. In 2018 zijn conservenerwten geteeld, zodat er na de vroege oogst voldoende tijd was voor bodemmaatregelen die in de zomerperiode moeten worden uitgevoerd. De erwten zijn op 13 juni geogst. Na de oogst van de erwten zijn de verschillende (bodem)maatregelen uitgevoerd (zie 2.2). In 2019 is prei als hoofdgewas geteeld. Omdat de prei vrij laat in het jaar wordt geplant, is in het voorjaar een mengsel van gerst-erwt als groenbemester ingezaaid. Het mengsel is op 29 maart gezaaid en de teelt is op 29 mei afgebroken. De groenbemester is geklepeld en licht ingewerkt, waarna eind juni vervolgens de prei is geplant. In 2020 is zomergerst geteeld. Na de oogst van de zomergerst in 2020 is bladrammenas ('Cordoba') als groenbemester ingezaaid. De bladrammenas is op 11 augustus gezaaid en op 30 november is de teelt afgebroken. De bladrammenas is geklepeld en licht gefreesd.

Tabel 2.1 Gewasrotatie Bodemgezondheidproef Vredepeel, 2017-2020.

Jaar	Hoofdgewas	Groenbemester	ras	Zaai/pootdatum	Oogstdatum
2017	Aardappel		Agria	7 april	30 augustus ¹
		Japanse haver	Pratex	7 september	Half december
2018	Conservenerwt		Selune	10 april	13 juni
		Bodemmaatregelen	-	juli	
2019	Prei	Gerst-erwt ²		29 maart	29 mei
			Belton	26 juni	5 november
2020	Zomergerst		Irina	28 mrt	20 juli
		Bladrammenas	Cordoba	11 augustus	30 november

¹ Loof aardappelen in biologisch systeem is op 31 juli afgebrand, aardappelen in gangbaar systeem zijn op natuurlijke wijze afgestorven.

² Gerst-erwt mengsel geteeld voorafgaand aan de preiteelt.

2.3 Maatregelen

In 2018 zijn conservenerwten geteeld en op 13 juni geoogst. Na de oogst van de erwten zijn de volgende (bodem)maatregelen uitgevoerd.

1. Zwarte braak/onbehandeld (CTR)

Dit object dient als controle, waarbij na de oogst van elk hoofdgewas geen aanvullende maatregelen zijn uitgevoerd, maar wel onkruidbestrijding. Afhankelijk van de onkruiddruk is minimaal één keer per maand het onkruid bestreden. In het biologische systeem zijn grondbewerkingen uitgevoerd, waarbij de bovenste laag van de bouwvoor licht werd gefreesd. In het gangbare systeem is het onkruid bestreden met glyfosaat (4L/ha, 360 g a.s. per liter).

2. Teelt gras/klaver (GRK)

Op 25 juli is met een handzaaimachine (Thilot) op een rijafstand van 10 cm het gras/klaver mengsel gezaaid (40 kg/ha). Het mengsel, bestaat voor 20% uit witte klaver (Alice) en voor 80% uit Engels raaigras (type Tetra-bg3). In beide teeltsystemen is biologisch (niet ontsmet) zaad gebruikt. Op 17 november is een opbrengstbepaling uitgevoerd en is de teelt afgebroken. Het gewas is geklepeld en circa 15 cm diep gefreesd.

3. Teelt *Tagetes patula* (TAG)

Op 25 juli is met een handzaaimachine (Thilot) op een rijafstand van 10 cm *Tagetes* (Ground Control) gezaaid (10 kg/ha). In het biologische systeem zijn de veldjes handmatig onkruidvrij gehouden. In gangbaar is het onkruid chemisch bestreden door enkele bespuitingen met lage dosering herbiciden. Op 17 november is een opbrengstbepaling uitgevoerd en is de teelt afgebroken. Het gewas is geklepeld en circa 15 cm diep gefreesd.

4. Teelt groenbemestermengsel (MIX)

Op 25 juli is met een handzaaimachine (Thilot) op een rijafstand van 10 cm het groenbemestermengsel HORRIDO gezaaid (30 kg/ha). Het mengsel bestaat uit veertien verschillende gewassen, waaronder een aantal kruis- en vlinderbloemigen en grasachtigen. Het mengsel heeft de volgende samenstelling (percentage zaden):

Alexandrijnse klaver (11%)	boekweit (5%)
mergkool (3%)	vlas (3%)
bladrammenas (1%)	Perzische klaver (23%)
Facelia (6%)	Japanse haver (3%)
Serradella (19%)	zonnebloem (1%)
Italiaans raaigras (18%)	winterbladkool (2%)
winterkoolzaad (3%)	winterwikke (2%)

Op 17 november is een opbrengstbepaling uitgevoerd en is de teelt afgebroken. Het gewas is geklepeld en circa 15 cm diep gefreesd.

5. Compost (CMP)

Op 16 juli is het compost-object aangelegd. Per veldje is 180 kg (50 ton/ha) natuurcompost opgebracht en 15 cm tot 20 cm diep gefreesd. Het analyserapport van de compost is weergegeven in bijlage 4.

6. Chitine (CHI)

Het chitine object is op 16 juli aangelegd. Per veldje is 36 kg (10 ton/ha) Gembri opgebracht en vervolgens 15-20cm diep gefreesd. Gembri is een granulair chitine-rijk materiaal dat is geïsoleerd uit de huidjes (exo-skeletten) van schaaldieren (kreeftachtigen, voornamelijk garnalenafval). De chemische samenstelling van dit product is weergegeven in bijlage 4.

7. Haarmeel (HRM)

Op 16 juli is per veldje 25 kg (7 ton/ha) haarmeel opgebracht en 15-20 cm diep gefreesd. Het haarmeel is geleverd door Darling Ingredients. Het product is gemaakt van varkenshaar. De resultaten van een chemische analyse zijn weergegeven in bijlage 4.

8. Anaerobe grondontsmetting (ASD)

Voor het uitvoeren van de ASD is op 17 juli per veldje 180 kg vers gras opgebracht (50 ton/ha). Het gras is circa 25 cm diep ingespit. Vervolgens zijn de veldjes berekend met 20 mm water en afgedekt met luchtdicht plastic (HyTibarrier-folie). Op 11 september, acht weken na de aanleg, is het folie weer verwijderd. Het zuurstofgehalte in de bodem onder het folie is de eerste twee weken elke drie dagen gemeten en vervolgens wekelijks. Vierentwintig uur na het aanleggen van de anaerobe grondontsmetting is het zuurstofgehalte in de bodem afgenomen naar minder dan 1 procent. Zes weken na aanleg neemt het zuurstofgehalte licht toe naar 1,5 tot 2%. De minerale inhoud van het gras is weergegeven in bijlage 4.

9. Grondontsmetting (ONT: NGO of CAL)

In het geïntegreerde systeem is op 19 juli een Natte Grondontsmetting (NGO) met Metamatrium (Monam) uitgevoerd. Met een spitinjecteur is 300 L/ha Monam ingespit. Het middel is op circa 28 cm diep in de bouwvoor ingebracht en is vervolgens door de hele bouwvoor gespit. Met de dichte rol die achterop de spitmachine is gemonteerd, is de grond licht aangedrukt en dichtgerold. De grond is vervolgens afgedekt met folie, zoals vereist is volgens de huidige voorschriften. Op 11 september is het folie van de veldjes gehaald.

In het biologische systeem worden geen chemische middelen gebruikt. In dit systeem is de "grondontsmetting" uitgevoerd met het zaadmeel product Terrafit®, een restproduct na oliewinning uit *Sarepta mosterd* (*Brassica juncea*). De naam van het product dat eerder voor deze maatregel is gebruikt is "Caliente", wat de verklaring is voor de gebruikte afkorting CAL. Per veldje is 25 kg (7 ton/ha) zaadmeel opgebracht en 25 cm diep ingespit. Vervolgens zijn de veldjes berekend met 20 mm water en afgedekt met luchtdicht plastic (HyTibarrier-folie) om aan te sluiten bij de behandeling in het gangbare systeem. De folie is op 11 september weer verwijderd. De zuurstofmetingen in dit object laten een vergelijkbaar verloop zien als bij de anaerobe grondontsmetting (zie maatregel 8). De minerale samenstelling van het zaadmeel is weergegeven in bijlage 4.

10. Combinatie-object (AHC)

In het combinatie-object zijn de behandelingen Anaerobe grondontsmetting, Haarmeel en Compost gecombineerd. Na afloop van de anaerobe grondontsmetting (zie maatregel 8) is op 20 september haarmeel (7 ton/ha) en compost (50 ton/ha) opgebracht en 10-15 cm diep gefreesd.

Door het toedienen van de verschillende producten (bodemmaatregelen) worden er extra nutriënten aan het systeem toegevoegd. In tabel 2.2 is de extra toevoer aan nutriënten via de producten die zijn toegediend weergegeven.

Met de teelt van groenbemesters worden geen extra nutriënten aan de bodem toegediend, behalve stikstof (N) dat extra wordt vastgelegd bij de teelt van vlinderbloemigen. De planten leggen wel nutriënten vast, die daardoor minder gevoelig zijn voor uitspoelen in de winter. De nutriënten komen bij verteren weer vrij voor een volggewas. Het verschilt per gewas hoeveel N, P en K per ha wordt vastgelegd (tabel 2.3, Bijlage 5).

Tabel 2.2 Dosering en mineralentoevoer bij toedienen van organische producten als bodemmaatregel.

Dosering/Mineraal	Eenheid	Compost	Chitine	Haarmeeel	Zaadmeel	Gras (ASD)
Dosering	kg/ha	50000	10000	7000	7000	50000
Droge stof	kg/ha	34950	8060	6797	6279	9000
N-totaal	kg/ha	339	756	911	322	334
Fosfor	kg/ha	-	131	16	64	34
Fosfaat	kg/ha	154	-	-	-	-
Kalium	kg/ha	350	73	11	55	234
Magnesium	kg/ha	105	33	4	26	43
Zwavel	kg/ha	35	77	128	80	43
Ruw eiwit	kg/ha	-	4344	6246	1984	2052
Natrium	kg/ha	-	168	9	*	54
Calcium	kg/ha	-	398	17	50	76
Chloor	kg/ha	38	226	12	6	149
Mangaan	g/ha	-	177	116	251	747
Zink	g/ha	6186	1008	1122	358	549
IJzer	g/ha	-	5690	2909	678	4662
Koper	g/ha	1014	422	97	57	101
Molybdeen	g/ha	-	3	1	4	29
Kobalt	g/ha	-	1918	435	*	824
Borium	g/ha	-	140	*	94	144
Koolzure kalk	g/ha	56	-	-	-	-

- niet gemeten; * beneden de detectiegrens.

Tabel 2.3 Productie en mineraleninhoud van de drie groenbemesters in de twee teeltsystemen in de bodemgezondheidsproef, gemeten in november 2018.

Teelt-systeem	Groen-bemester	Vers gewicht (ton/ha)	Droge stof (kg/ha)	Mineralen vastlegging (kg/ha)		
				N	P	K
BIO	GRK	16.6	2420	--	--	--
	TAG	40.7	5875	123	24	247
	MIX	27.1	3525	102	7	74
GBR	GRK	18.8	2760	86	8	80
	TAG	36.0	5180	88	10	155
	MIX	28.1	3690	74	11	118

- niet gemeten.

2.4 Bemesting

In tabel 2.4 is de organische bemesting en de bemesting met kunstmest weergegeven. De bemesting in zowel het biologische als in het gangbare systeem is afgestemd op de behoefte van het gewas in de controle. Nutriënten die met een deel van de bodemmaatregelen worden toegediend zijn extra.

In het biologische systeem is alleen bemest met organische mest (volgens SKAL-richtlijnen) en in het gangbare systeem met organische mest, aangevuld met N en K in de vorm van kunstmest (tabel 2.4). De kunstmest is in meerdere giften toegediend. Zowel in het biologische als in het gangbare systeem is de grond vóór de teelt bewerkt door 25 cm diep te spitten.

Tabel 2.4 Bemesting Bodemgezondheidproef 2017-2020, Vredepeel. Er is geen extra P als kunstmest toegediend.

Jaar/gewas	systeem	Vaste	Rundvee	Vinassekali	Kunstmest	Kunstmest
		rundermest (m ³ /ha)	drijfmest (m ³ /ha)	(m ³)/ha)	N (kg/ha)	K ₂ O (kg/ha)
2017/aardappel	BIO	25	25	-	-	-
	GBR	-	40	-	110	-
2018/erwt	BIO	-	22	-	-	-
	GBR	-	22	-	-	-
2019/prei	BIO	-	25+40*	4	-	-
	GBR	-	25+40*	-	195	75
2020/gerst	BIO	-	30 + 25**	-	-	-
	GBR	-	0 + 25**	-	90	90

* In maart is 25 m³ rundveedrijfmest (RVDM) RVDM toegepast voorafgaand aan de teelt van de groenbemester, een mengsel van gerst-erwt. In juni is 40 m³ RVDM toegepast voor de teelt van de prei

** In het biologische systeem is vóór de teelt van zomergerst RVDM toegepast. In beide systemen is het proefveld na de oogst van de zomergerst bemest met 25m³ RVDM, voorafgaand aan de teelt van bladrammenas.

2.5 Metingen en bemonsteringen

Voor het meten van de uiteenlopende aspecten van het bodemmicrobioom zijn verschillende technieken gebruikt. Voor een overzicht van het tijdstip van de metingen zie fig 2.1.

Op de verschillende tijdstippen is grond verzameld. Per netto veldje (1,5 x 2,7m) is de bovenste 25 cm van de bouwvoor bemonsterd. Verspreid over het netto veldje is met een 12 mm grondboor grond verzameld; 2 tot 5L afhankelijk van de hoeveelheid grond die nodig was voor de diverse analyses/toetsen. Het totale monster werd gemengd en opgedeeld in submonsters bestemd voor de verschillende analyses en toetsen.

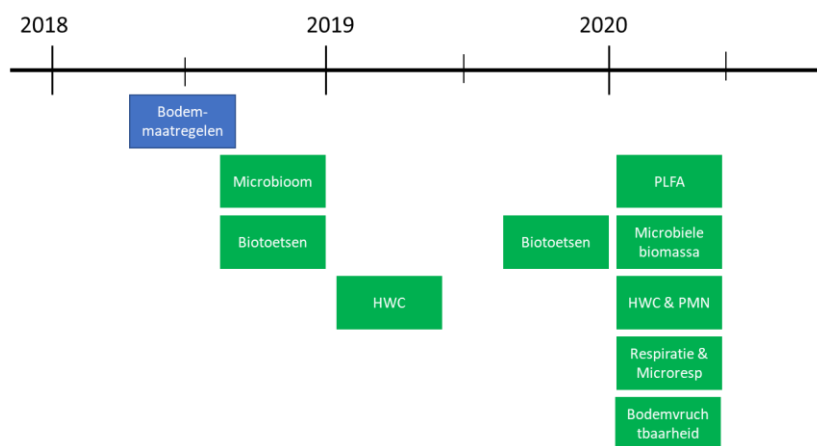


Fig. 2.1: Tijdschema van de toepassing van bodemmaatregelen en de verschillende metingen.

2.5.1 Bodemmicrobioom

Het bepalen van de sequenties van schimmel- en bacteriën-markergenen staat een nauwkeurige bepaling van de samenstelling van de microbiële gemeenschap toe en geeft uitsluitel over de aanwezigheid van specifieke soorten.

De hoeveelheid bacteriële DNA is gemeten met een qPCR met de primers Eub33: 3' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-5' en Eub518: 3'- ATTACCGCGGCTGCTGG-5'. De hoeveelheid schimmel DNA is bepaald met twee qPCRs met verschillende primer sets. Primer set 1: 5.8S-Fun: 3'-

AACTTTYRRCAYGGATCWCT-5' en ITS4_Fun: 3'- AGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART-5'. Primer set 2 (Fierer): ITS1f: 3'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-5' en 5.8s: 3'- CGCTGCGTTCTTCATCG-5'.

2.5.2 Biotoetsen

Met behulp van biotoetsen kan de weerbaarheid van de bodem tegen verschillende ziekteverwekkers onder gecontroleerde omstandigheden worden vastgesteld. Voor het toetsen van de weerbaarheid van de verschillende behandelingen werd grond uit het veld (een mengmonster van ca. 2,2 kg per veldje) gebruikt in biotoetsen met *Rhizoctonia solani* en *Pythium ultimum*.

Ziektevering tegen *R. solani* werd bepaald door de ziekteverspreiding van dit pathogeen in suikerbieten-zaailingen te meten. De toets werd uitgevoerd in een klimaatcel bij 23/18 °C (dag-/nachttemperatuur) in rechthoekige tanks (4 x 25 cm) gekoppeld aan een automatisch watergeefstelsel waarmee de vochtspanning van de grond op -50 mbar (pF 1.7) werd ingesteld. Suikerbietenzaden (F763156, met standaard zaadbehandeling hymexazol, thiram en het insecticide Gaucho1; SESVanderHave, Rilland, NL) werden gezaaid in twee rijen met een afstand van 2 cm. In totaal werden 22 zaden per tank gebruikt. Na opkomst van de zaden werd vooraan elke rij het pathogeen toegevoegd. Hiervoor werden vijf haverkorrels, gekoloniseerd met *R. solani* AG 2-2IIIB isolaat 12-194a (IRS, Bergen op Zoom, Nederland), 2 cm voor de zaailingen net onder het grondoppervlak aangebracht. Ziekteverspreiding werd tweemaal per week bepaald door de aangetaste zaailingen te scoren (bruinigrijze laesies op de stengel, verwelkte en dode planten). Ziekteverspreiding 3 weken na inoculatie werd gebruikt voor vergelijking van gegevens, aangezien in deze periode in een deel van de tanks de maximale ziekteverspreiding van 22 cm werd bereikt.

De ziektevering van de grond tegen *Pythium ultimum* werd getest met tuinkers gebruikt (Bongiorno et al., 2019). Aan de helft van de te testen grond van elke plot werd *P. ultimum* toegevoegd (0,25 g *Pythium* kweek (in gierst)/liter grond). De rest van de grond werd niet besmet met *P. ultimum* om de natuurlijke infectie in de grond te bepalen. Grond werd goed gemengd in een plastic zak en twee dagen geïncubeerd bij 20 °C. Daarna werden per veldje steeds 4 potjes (Ø 6 cm, 95 ml) gevuld met *Pythium* geïnculeerde grond en 4 potjes met niet geïnculeerde grond. Op het oppervlak van elk potje werd 0,5 g onbehandelde biologische tuinkers zaden (*Lepidium sativum*, De Bolster, Epe, Nederland) verspreid (Figuur 4.2). Alle potjes werden individueel op een schotelteje geplaatst om kruisbesmetting tussen verschillende behandelingen te voorkomen. Potten werden per blok gerandomiseerd en geïncubeerd in een klimaatcel bij 23/18 °C (dag/nacht) met een daglengte van 16 uur en 60% relatieve luchtvochtigheid. De eerste twee dagen na het zaaien waren de potjes met een plastic folie afgedekt om verdamping te beperken en te zorgen voor een hoge relatieve vochtigheid om kieming van de zaden te bevorderen. Na drie dagen werd het plastic folie verwijderd en de potten kregen indien nodig van onderaf water. Zeven dagen na het zaaien werd het percentage zieke planten per potje geschat (naar oppervlakte) en werd het versgewicht van de bovengrondse delen per pot bepaald door de scheuten met een schaar direct boven de grond af te knippen en te wegen.

2.5.3 PLFA

Alle PLFA metingen zijn uitgevoerd door Eurofins, gebaseerd op 30 biomarkers. Hiervoor werd een grondmonster van 500/1000 g verse grond gedroogd, gemalen en gezeefd. Een vastefase-extractie is uitgevoerd en de extracten zijn gemeten met GC-MS. De meting van fosfolipid fatty acids (PLFA) geeft zowel een inschatting van de hoeveelheid van schimmels en bacteriën als een opdeling in enkele functionele groepen, zoals Actinobacteria en mycorrhiza.

2.5.4 Microbiële biomassa

Bacteriële biomassa werd bepaald door kleuring met DTAF, gevolgd door confocal laser microscopie en geautomatiseerde beeldanalyse. Schimmels werden met twee kleurstoffen "fluorescent brightener" en "europium chelate" gekleurd, waarna de lengte van de schimmeldraden microscopisch werd bepaald.

2.5.5 HWC en PMN

Fysische en chemische eigenschappen van alle grondmonsters zijn bepaald met behulp van de standaardprocedures van de Bemestingswijzer (Eurofins Agro, Wageningen NL). Heet-water extraheerbare koolstof (HWC) werd gemeten als de toename in opgelost organische koolstof na 16 uur extractie van 4 g grond in 30 ml water bij 80 °C (Ghani et al., 2003); dit is een maat voor de hoeveelheid labiele koolstof in de bodem. Potentieel mineraliseerbare stikstof (PMN) werd gemeten als de toename van ammonium (NH₄⁺) gedurende een week anaerobe (waterverzadigde) incubatie van 16 g grond in 40 ml water bij 40 °C (Keeny and Nelson, 1982; Canali and Benedetti, 2006).

2.5.6 Bodemrespiratie en Microresp

De bodemrespiratie is een indicator voor de algemene activiteit in de bodem, terwijl Microresp een indicator is voor de functionele activiteit gemeten bij de afbraak van een reeks organische stoffen.

Bodemrespiratie werd gemeten door het SoilBiologyLab te Wageningen.

Voor de Microresp methode zijn 8 substraten gebruikt, water, glucose, lignine, alanine, aminoboterzuur, n-acetyl glucosamine, alfa-ketoglutaraat en appelzuur. Deze substraten zijn met een concentratie van 30 mg g⁻¹ C toegevoegd aan de bodemmonsters. Respiratie na toevoeging van de substraten werd gemeten door een kleuromslag in een indicator kleurstof. De waardes zijn gecorrigeerd door aftrekken van de watercontrole. Multiple substrate induced respiration (MSIR) werd berekend als som van de respiratie van alle substraten per monster. De relatieve respiratie werd berekend door de respiratie van ieder enkel substraat te delen door de MSIR-waarde.

2.6 Statistische verwerking

Voor alle analyses is in eerste instantie gebruik gemaakt van een linear mixed model met als random variabele Block:Landbouw om rekening te houden met de split-plot opzet van de veldproef. Dit model is, als mogelijk, in een latere stap versimpeld afhankelijk van welke factoren een significant effect bleken te hebben. Ook is er gekeken of de data voldoet aan de aannames voor een linear mixed model. Als deze aannames niet gewaarborgd zijn is gebruik gemaakt van een niet-parametrisch model.

De sequentiedata is in een eerste stap bewerkt met het pakket phyloseq in R Studio. OTUs die minder dan 20 keer in het gehele dataset voorkomen zijn verwijderd. Vervolgens zijn de OTUs gefilterd met een prevalence threshold van 4 (aanwezigheid van het OTU in de dataset) voor bacteriën en voor schimmels. De Shannon diversiteits-indices zijn berekend voor ieder monster. Multivariate analyses zijn uitgevoerd met behulp van een nonmetric multidimensional scaling (NMDS) benadering. Hoe belangrijk de effecten van landbouw en behandeling zijn is vastgesteld met een cca en de ordistep() functie.

De mogelijke correlaties van bodemchemische parameters, PLFAs, HWC en de microresp resultaten zijn eveneens vastgesteld met de ordistep functie.

Welke soorten van zowel bacteriën als schimmels verschillen tussen gangbare en biologische landbouw en de verschillende behandelingen is vastgesteld met het pakket DESeq2.

3 Resultaten

Het effect van de maatregelen op het bodemmicrobioom, bodemweerbaarheid, PLFA samenstelling, microbiële biomassa, HWC, PMN, bodemrespiratie en Microresp wordt in dit hoofdstuk beschreven.

3.1 Bodemmicrobioom

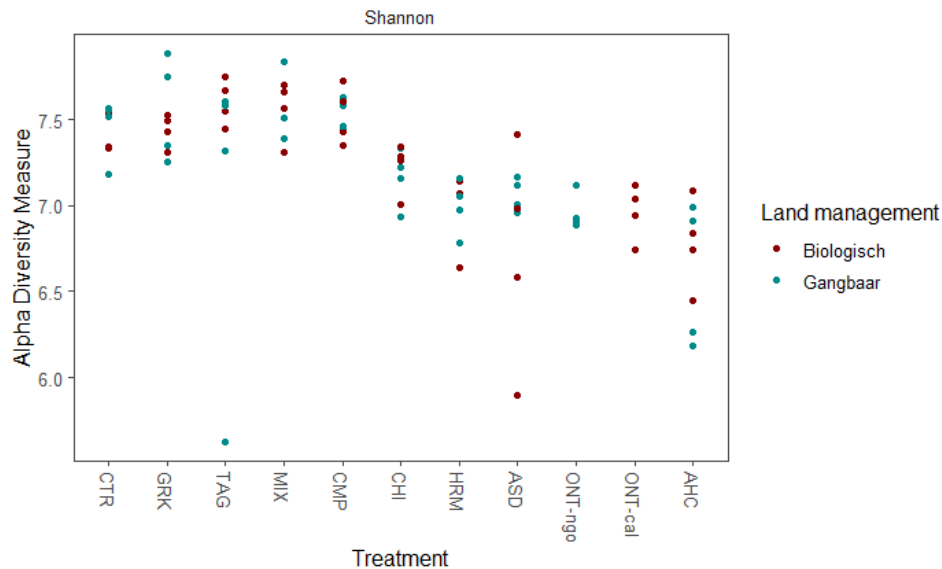
Het bodemmicrobioom is geanalyseerd in bodemmonsters van november 2018, in de periode na de bodembehandelingen.

3.1.1 Diversiteit

De Shannon diversiteits-index van bacteriële taxa (OTUs) was het hoogst in de controle en het groenbemestermengsel, de compost en gras/klaver behandeling (Fig. 3.1a). De haarmeel, grondontsmetting, anaerobe ontsmetting en combi behandeling bevatten de laagste diversiteit van bacteriën. Er was geen verschil in diversiteit tussen de twee landbouwsystemen.

Ook de Shannon diversiteits-index van schimmel OTUs was het hoogst in de controle, groenbemestermengsel, compost, en gras/klaver behandeling (Fig. 3.1b). De haarmeel en tagetes behandeling weken niet significant af van de controle. De chitine, ASD, grondontsmetting en combi behandeling gaven een significant lagere diversiteit. De laagste diversiteit werd gevonden voor de ONT-cal behandeling in de biologische landbouw.

a



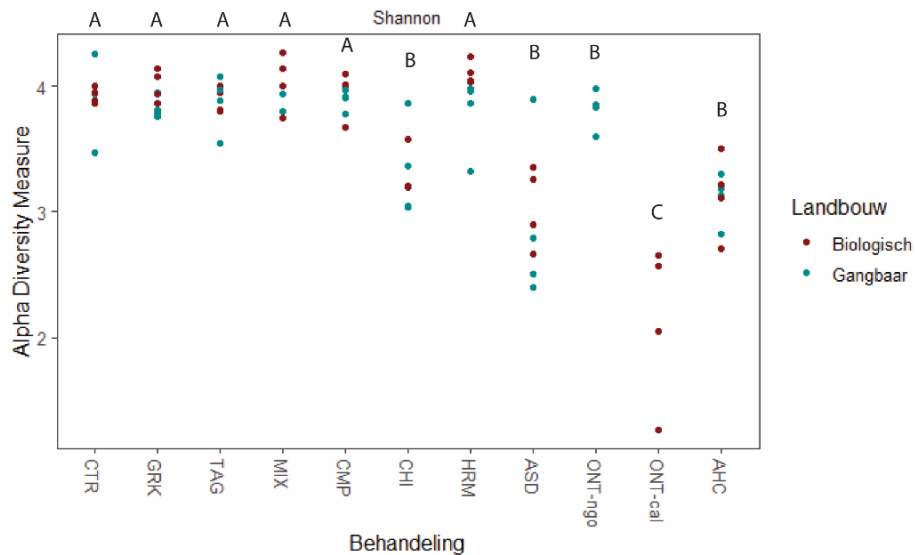
b

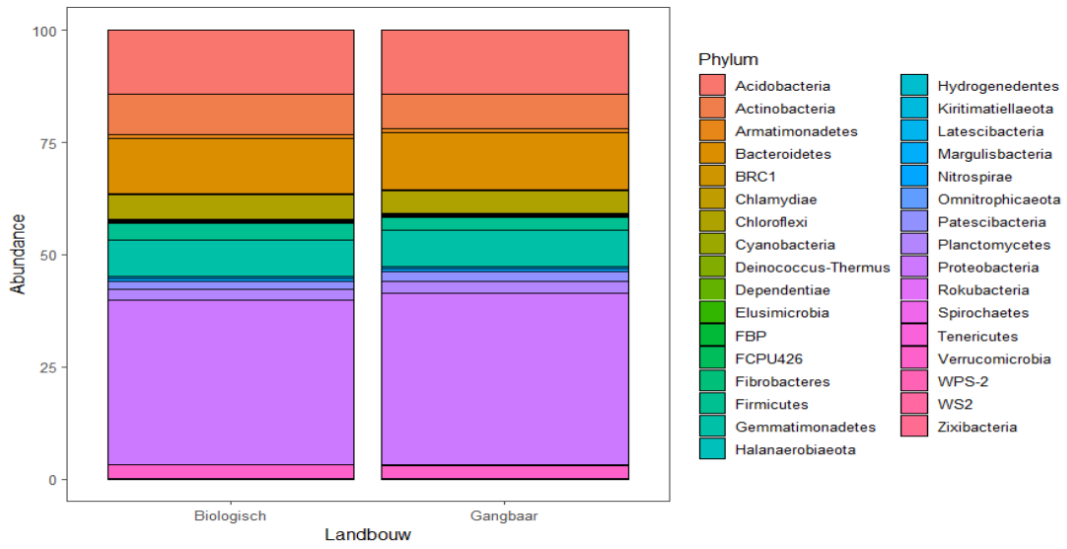
Fig. 3.1: Shannon diversiteit index in de verschillende behandelingen voor a) bacteriële OTUs en b) schimmel OTUs.

3.1.2 Schimmel- en bacteriegemeenschap

De relatieve abundantie van de verschillende phyla was relatief homogeen tussen de twee landbouwsystemen voor zowel bacteriën als schimmels (Fig. 3.2). Bij de bacteriën zijn tussen de verschillende behandelingen enkele verschillen te zien (Fig. 3.3a), zoals een lagere abundantie Acidobacteria in de combi-behandeling en hogere abundantie Firmicutes in de ONT-cal en ASD-behandeling. Bij de schimmels valt op dat de relatieve abundantie van Mortierellamycota in de CHI en AHC-behandeling hoog is (Fig. 3.3b). Deze groep is bijzonder laag in de ontsmettings-behandelingen.

Een (Non-metric multidimensional scaling) NMDS-analyse laat zien dat er weinig verschillen zijn in de bacteriële gemeenschap in het biologische en gangbare landbouwsysteem (Fig. 3.4a) en hetzelfde geldt voor schimmels (Fig. 3.4b). De grote spreiding van tussen de monsters is vooral veroorzaakt door de verschillen tussen de behandelingen (Fig. 3.5). Zo waren vooral de behandelingen combi (AHC), ONT-cal, ASD en CHI apart geclusterd van de overige behandelingen en bij de bacteriën ook HRM en ONT-ngo. Uit een permanova analyse van alleen de behandeling blijkt een significant effect van zowel het landbouwsysteem (bacteriën: $F=3.71$, $p=0.001$, schimmel: $F=6.11$, $p=0.001$) als de behandelingen (bacteriën: $F=6.27$, $p=0.001$, schimmel: $F=15.11$, $p=0.001$) na correctie voor het blokeffect.

a



b

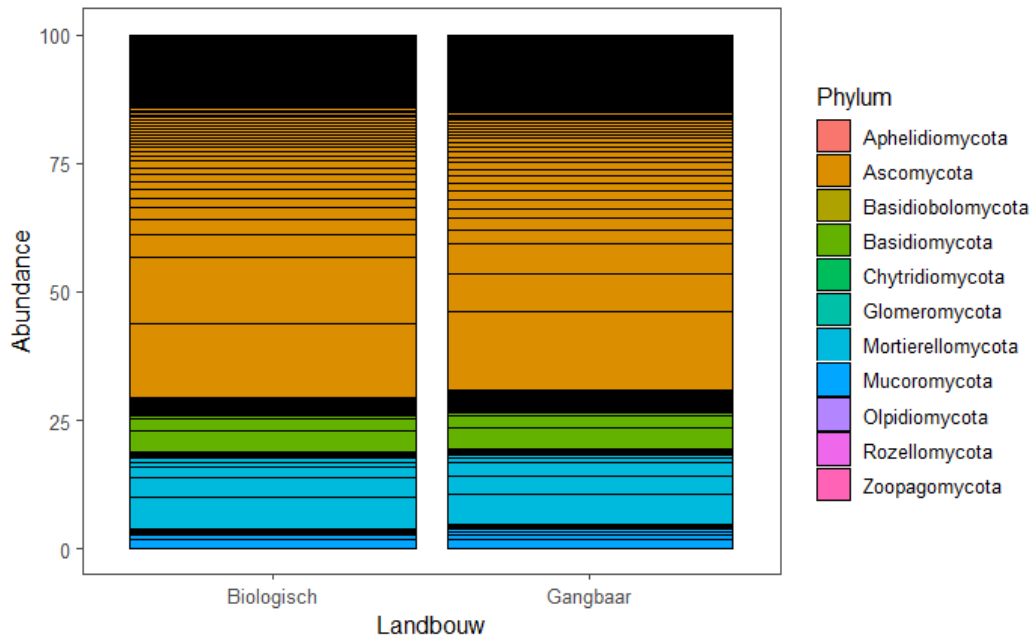


Fig. 3.2: Gemiddelde relatieve abundantie a) bacteriële b) schimmel phyla in de twee landbouwsystemen.

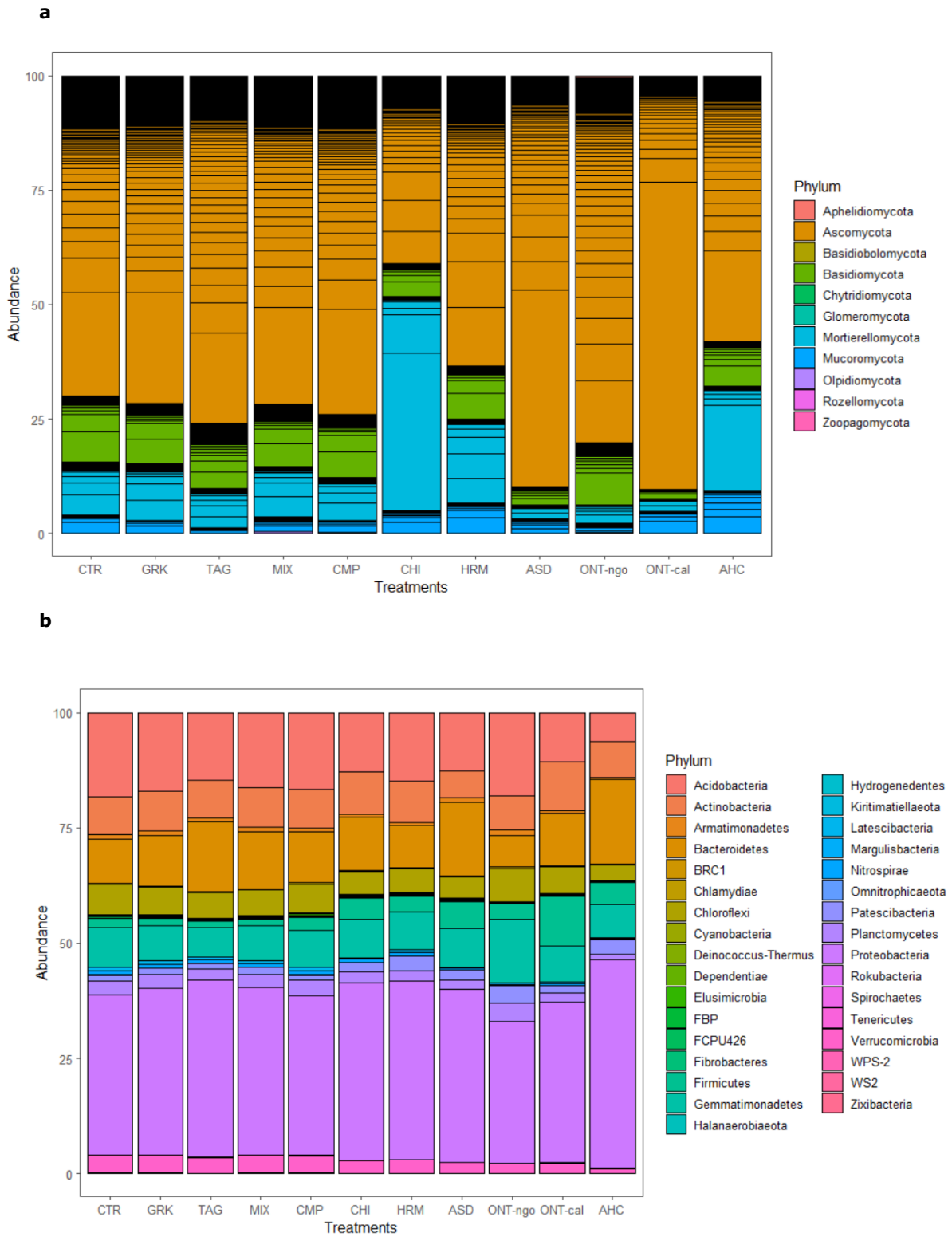
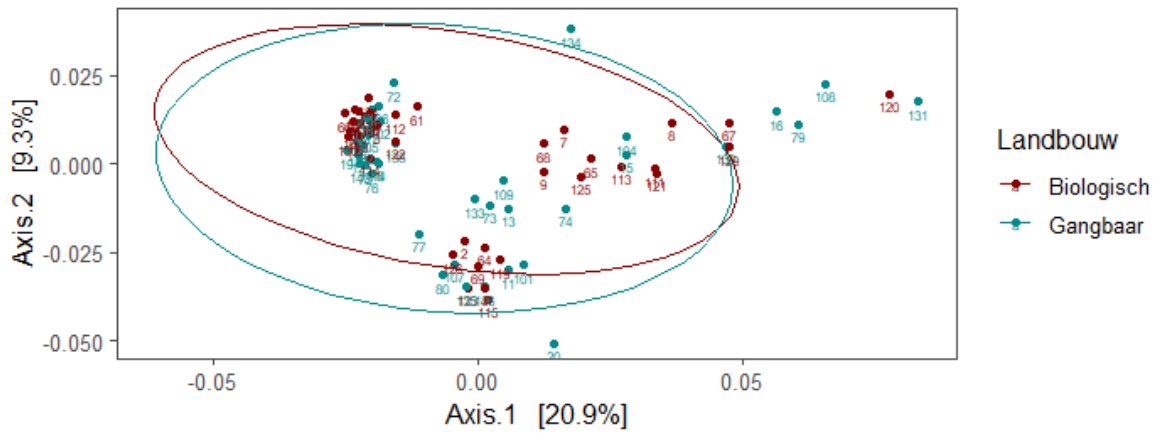


Fig. 3.3: Gemiddelde relatieve abundantie a) bacteriële b) schimmel phyla in de verschillende behandelingen

a



b

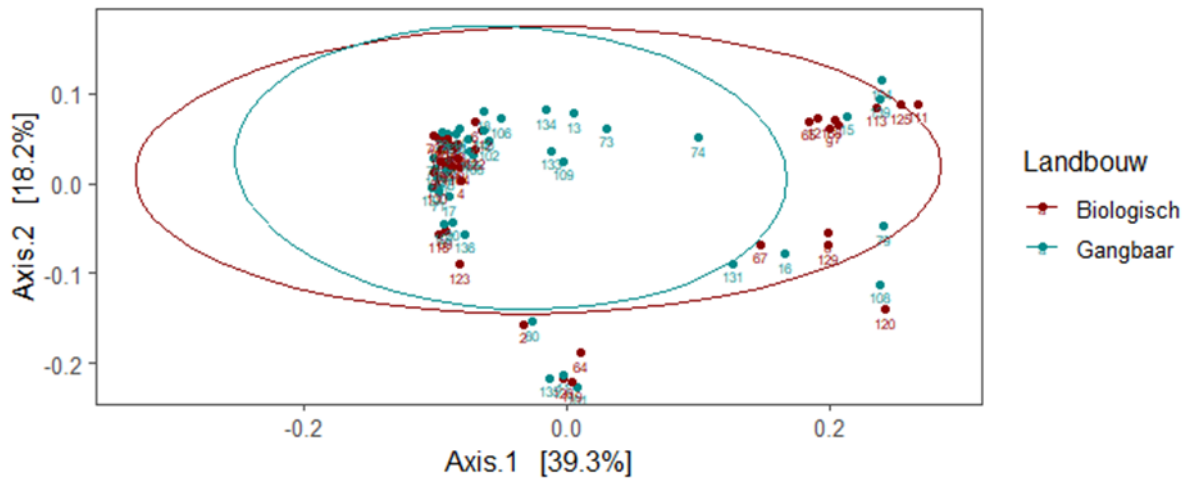


Fig. 3.4: NMDS analyse van de a) bacteriële gemeenschappen en b) schimmel gemeenschappen in alle monsters, gekleurd volgens het landbouwsysteem.

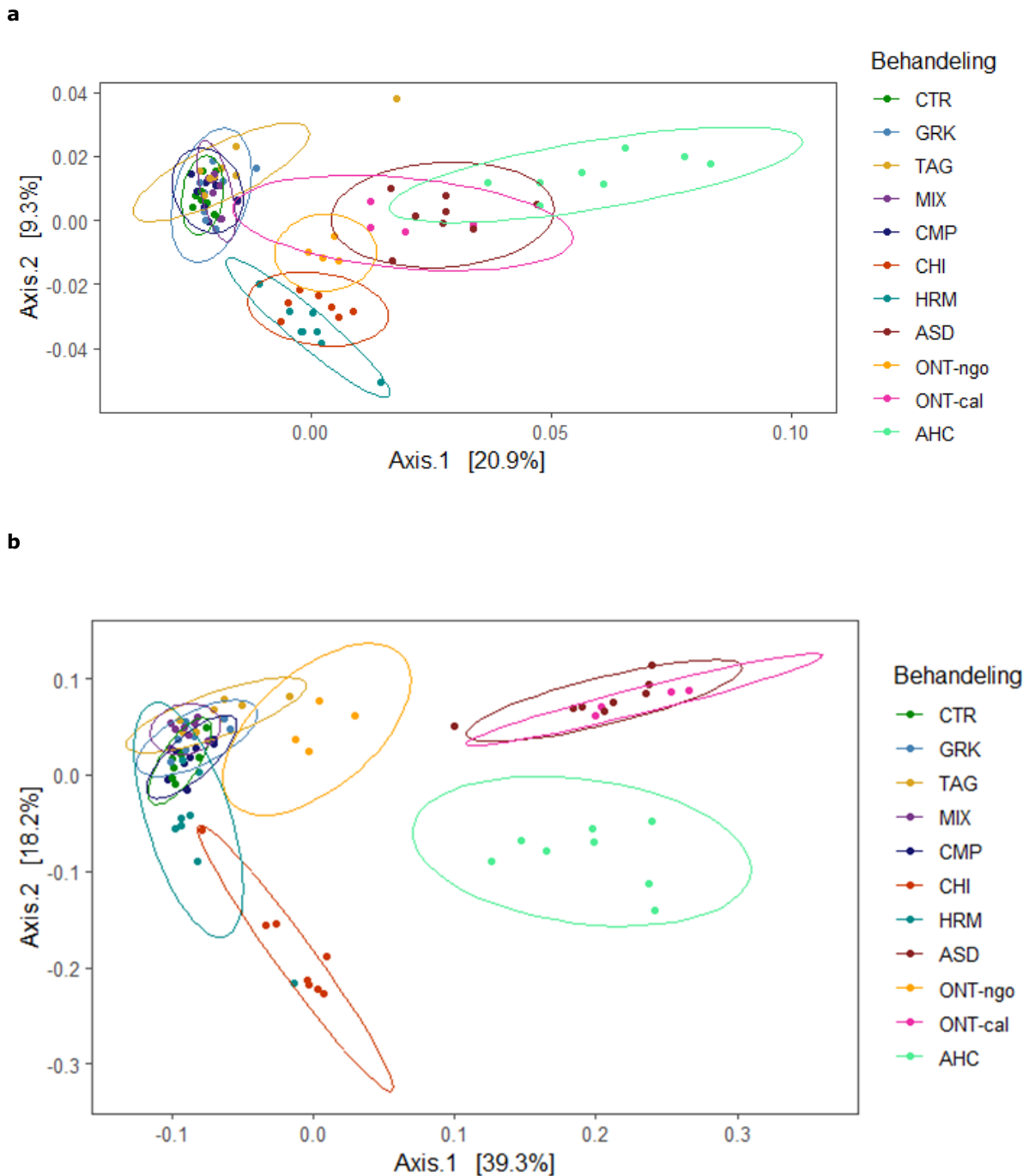


Fig. 3.5: NMS analyse van de a) bacteriële gemeenschappen en b) schimmel gemeenschappen in alle monsters, gekleurd volgens de behandelingen.

3.1.3 Differentiële abundantie

Het aantal en de identiteit van taxa die verschillen in abundantie werd bepaald voor biologisch vs. gangbare landbouw en de controle behandeling vs. compost of vs. de combi Behandeling te bepalen. Verder werd de combi behandeling vergeleken met de anaerobe ontsmetting.

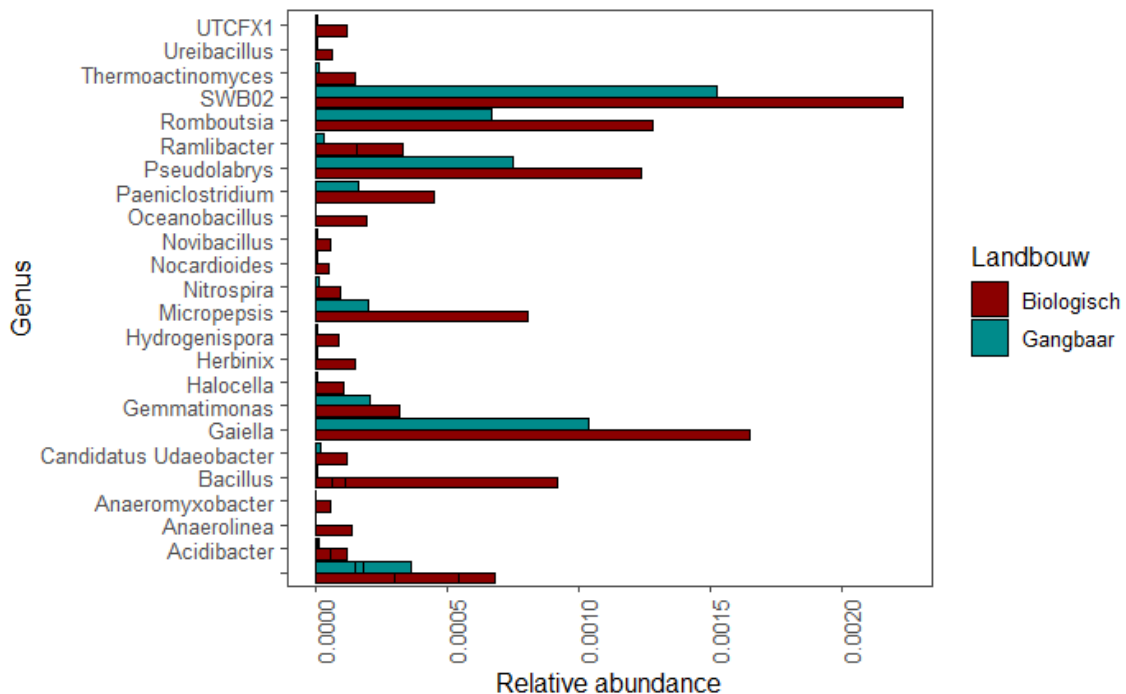
In totaal verschilden voor bacteriën de abundantie van 69 OTUs, behorend tot 23 genera, significant tussen de biologische en de gangbare landbouw. Genera met een hogere abundantie in het biologische landbouwsysteem waren onder ander *SWB02*, *Pseudolabrys*, *Gaiella* en *Bacillus*, terwijl genera met een hogere abundantie in de gangbare landbouw vooral *Brevundimonas* en *Acidibacter* omvatten (Fig. 3.6a). Bij de schimmels verschilden 71 OTUs, behorend tot 20 genera, significant tussen de twee landbouwsystemen (Fig. 3.6b). De genera *Trichoderma* en *Ascobolus* waren duidelijk meer abundant in

het biologische landbouwsysteem en de genera *Rhizopus*, *Mortierella* en *Pseudeurotium* waren significant meer abundant in het gangbare systeem. Vanwege de korte sequenties is niet te zeggen om welke soorten het gaat en of ze al dan niet pathogeen zijn.

Genera met een hogere abundantie in de combi behandeling vergeleken met de controle waren onder ander de bacteriën *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* en *Bacillus* (Fig. 3.7a) en de schimmels *Fusarium* en *Solicoccozyma* (Fig. 3.7b). In de controle behandeling werd een hogere abundantie van onder ander de bacteriën *Sphingomonas* en *Pseudarthrobacter* en de schimmels *Trichoderma* en *Pseudeurotium* gevonden. Genera met een hogere abundantie in de compost behandeling waren onder ander *Streptomyces*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium* en *Phenylobacterium* (Fig. 3.8a) en de schimmels *Typhula*, *Itersoniia*, *Cladosporium* en *Alternaria* (Fig. 3.9b). Ook hier is niet bekend of het gaat om pathogene soorten.

Verder werden de abundanties van bacteriën en schimmels in de combi behandeling vergeleken met die in de anaerobe ontsmetting die gedeeltelijk overlapt met de combi behandeling in de multivariate analyse, maar geen verhoogde weerbaarheid toonde. Bacteriële genera die meer abundant waren in de combi behandeling dan in de anaerobe ontsmetting waren onder ander *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Brevundimonas* en *Acinetobacter* (Fig. 3.9a). Schimmel genera met een hogere abundantie in de combi behandeling waren vooral *Mucor*, *Mortierella* en *Fusarium* (Fig. 3.9b).

a



b

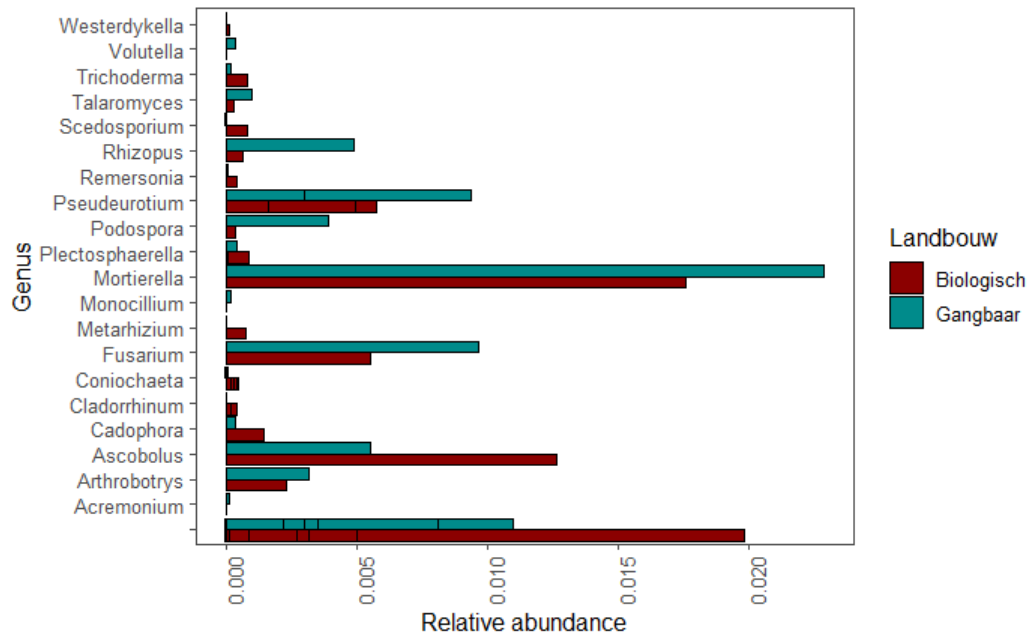
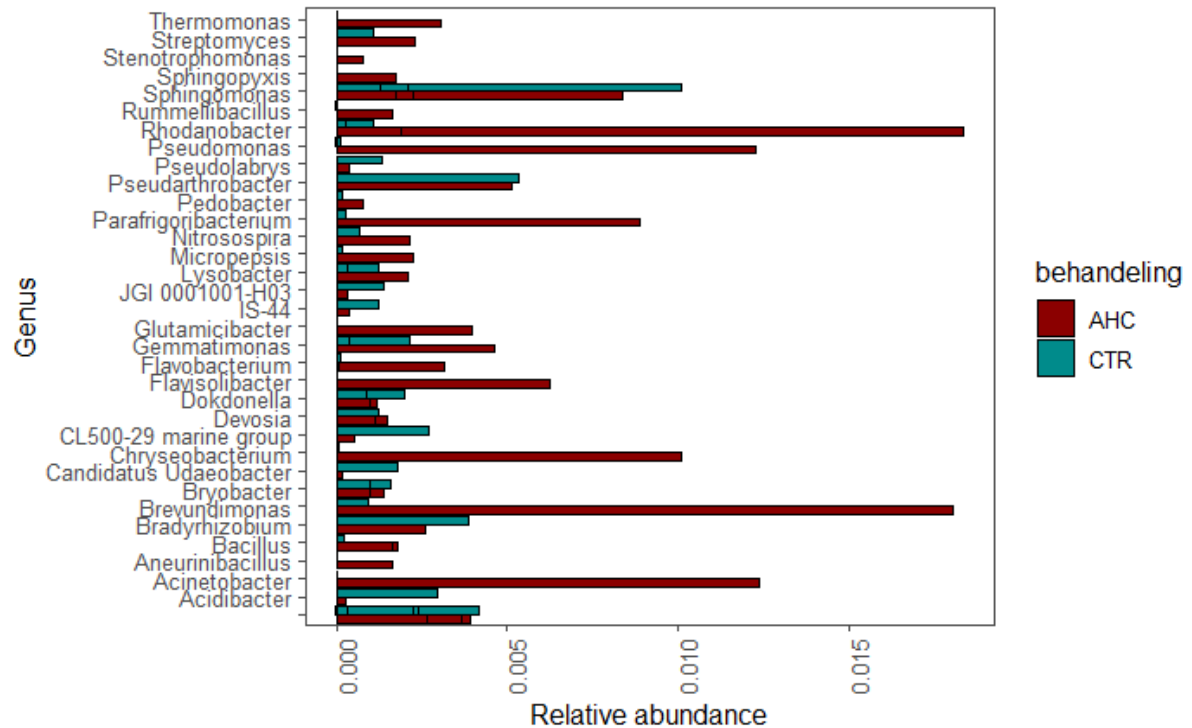


Fig. 3.6: Gemiddelde relatieve abundantie van a) bacteriële, b) schimmel genera met significant verschillende abundantie tussen het biologische en het gangbare landbouwsysteem; de onderste rij toont OTUs die niet tot op geslachtsniveau zijn geïdentificeerd.

a



b

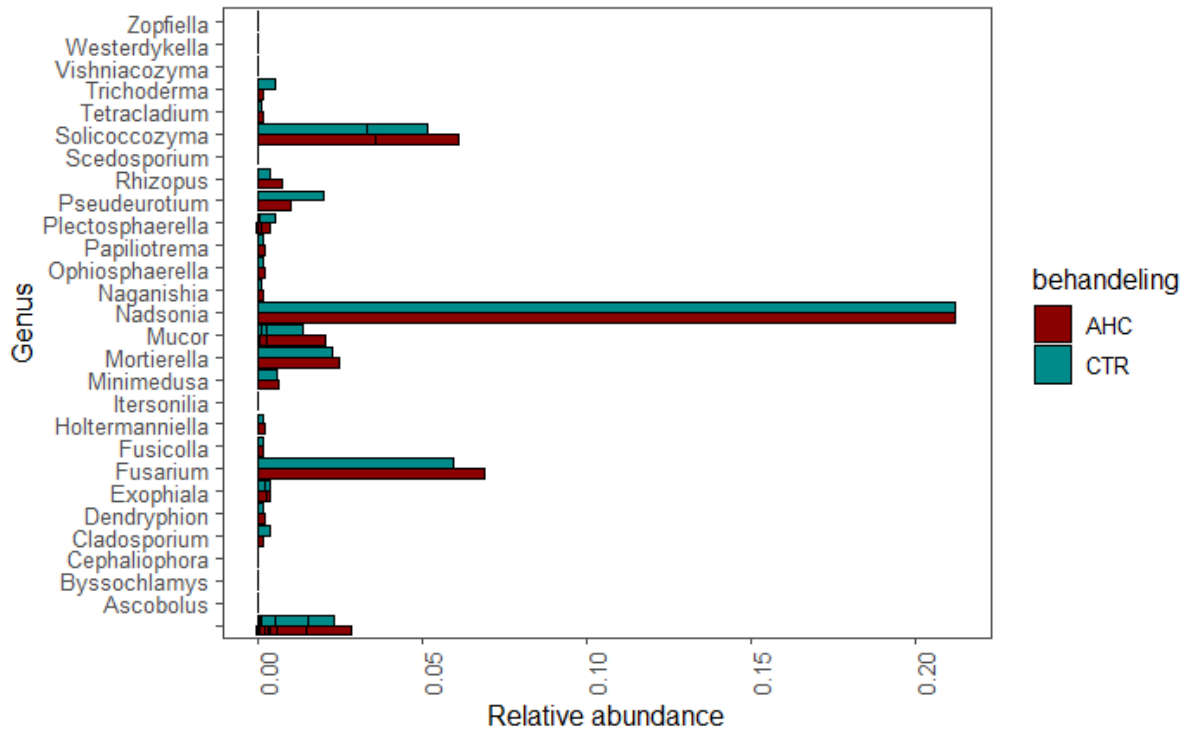
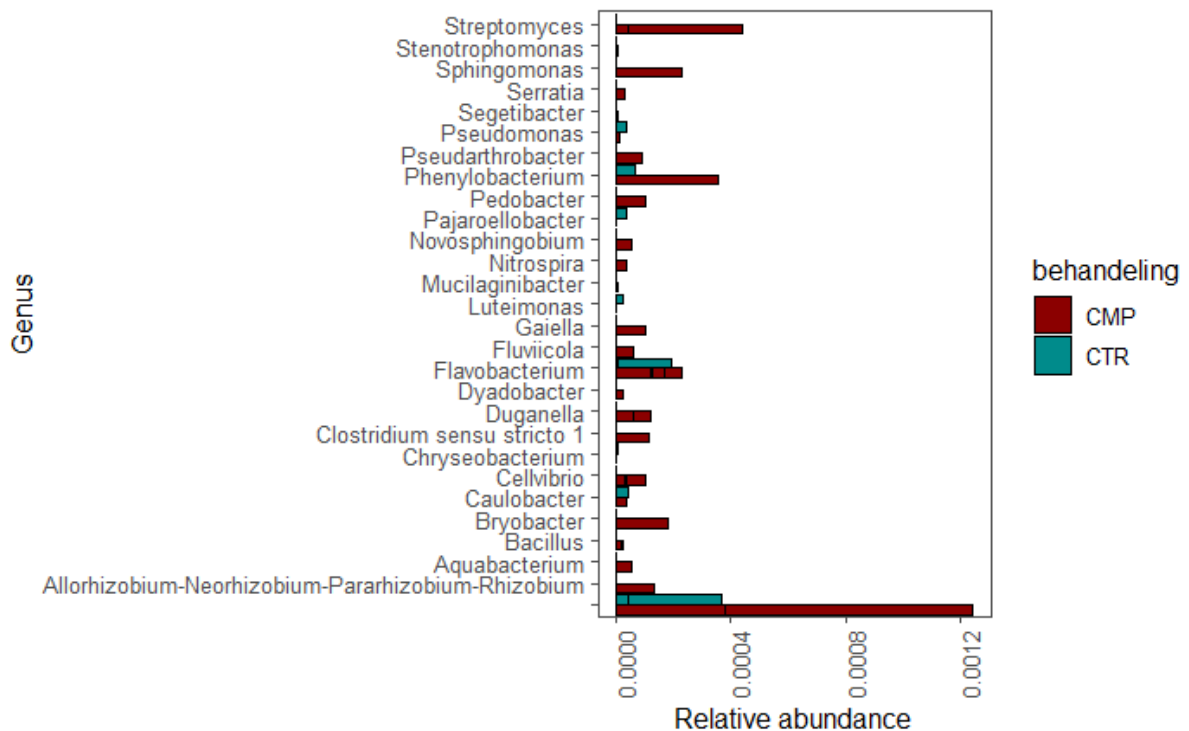


Fig. 3.7: Gemiddelde relatieve abundantie van a) bacteriële, b) schimmel genera met significant verschillende abundantie tussen de combi behandeling en de controle; de onderste rij toont OTUs die niet tot op geslachtsniveau zijn geïdentificeerd.

a



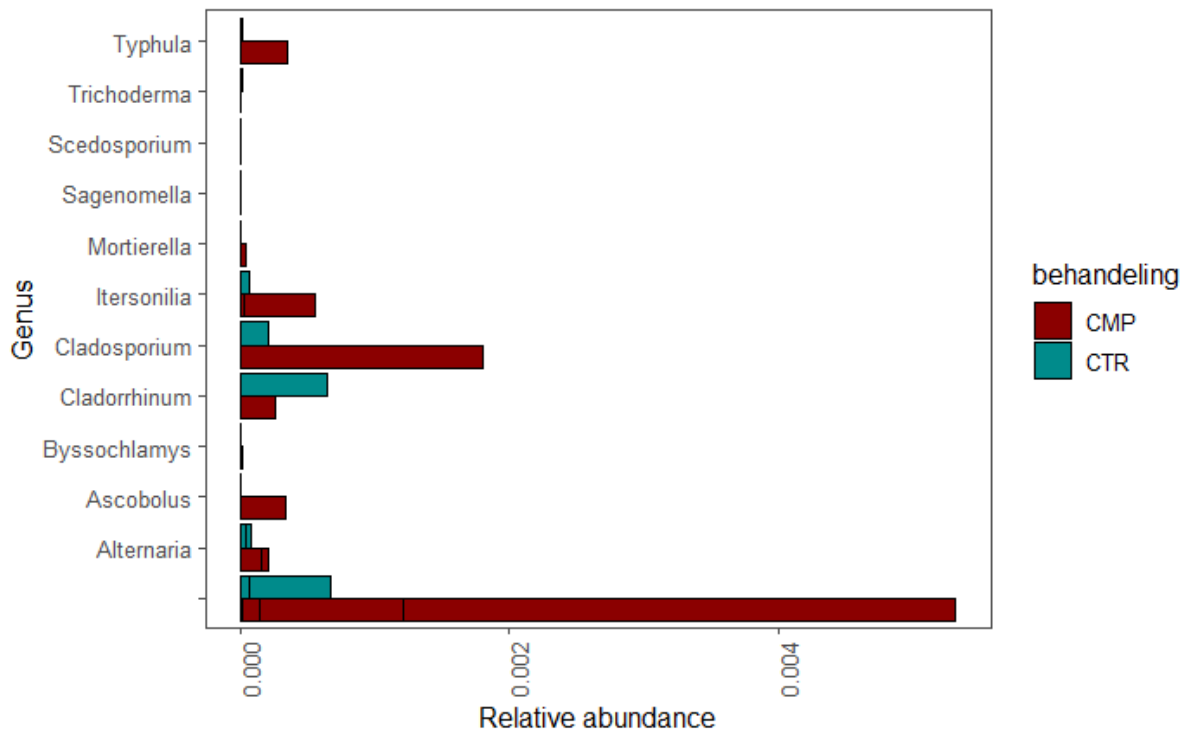
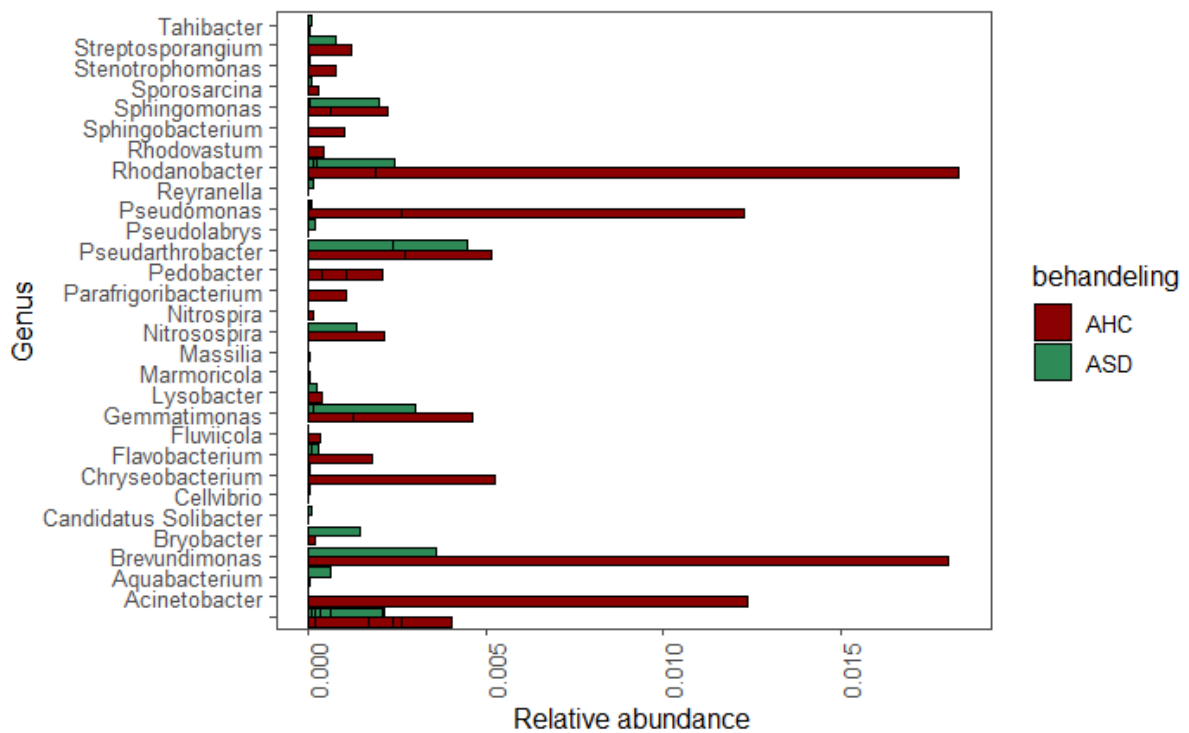
b

Fig. 3.8: Gemiddelde relatieve abundantie van a) bacteriële, b) schimmel genera met significant verschillende abundantie tussen de compost behandeling en de controle; de onderste rij toont OTUs die niet tot op geslachtsniveau zijn geïdentificeerd.

a

b

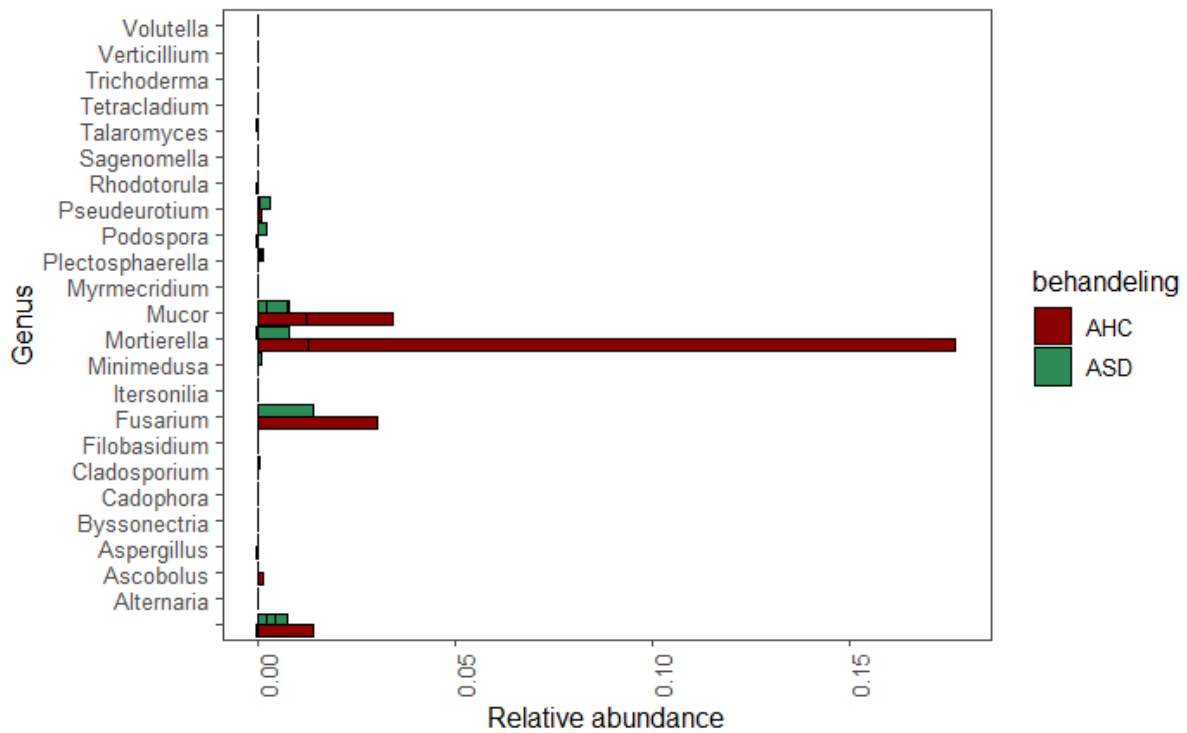


Fig. 3.9: Gemiddelde relatieve abundantie van a) bacteriële, b) schimmel genera met significant verschillende abundantie tussen de combi (AHC) behandeling en anaerobe ontsmetting (ASD); de onderste rij toont OTUs die niet tot op geslachtsniveau zijn geïdentificeerd.

3.1.4 Abundantie schimmel- en bacterie DNA

Meting van de abundantie van schimmel en bacterie DNA is uitgevoerd in November 2018 middels qPCR

De twee primers sets die zijn gebruikt voor het kwantificeren van schimmel- DNA tonen een goede correlatie (Fig. 3.10). Beide tonen een significant hogere concentratie in de ASD, ONT-cal en combi behandeling, maar een lage concentratie in de Ont-ngo behandeling (Fig. 3.11). Met de Fierer primers is ook de DNA concentratie in de chitine en haarmeel behandeling hoger. De concentratie van bacteriële DNA was alleen verhoogd in de combi behandeling (Fig. 3.12).

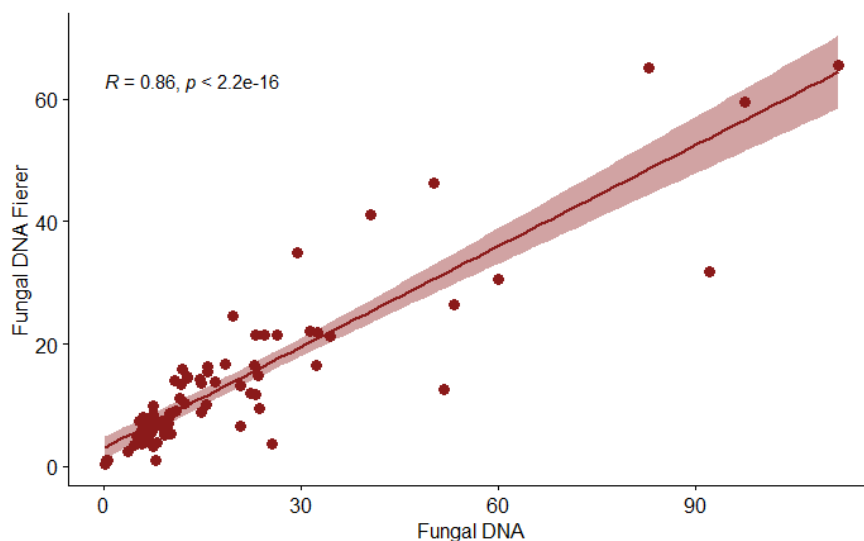


Fig. 3.10: Correlatie tussen DNA concentratie (pg/ μ l) gemeten met de Fierer primers en de 5.8S-Fun en de ITS4-Fun primers.

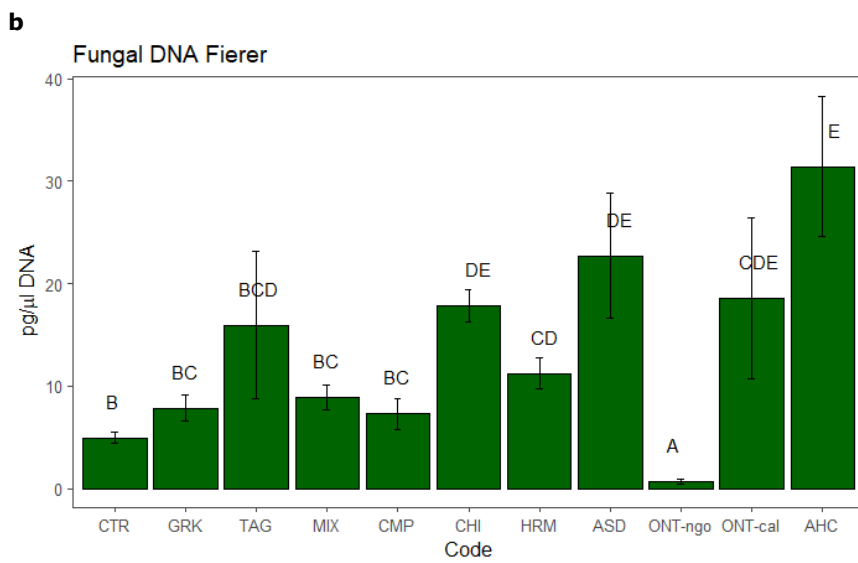
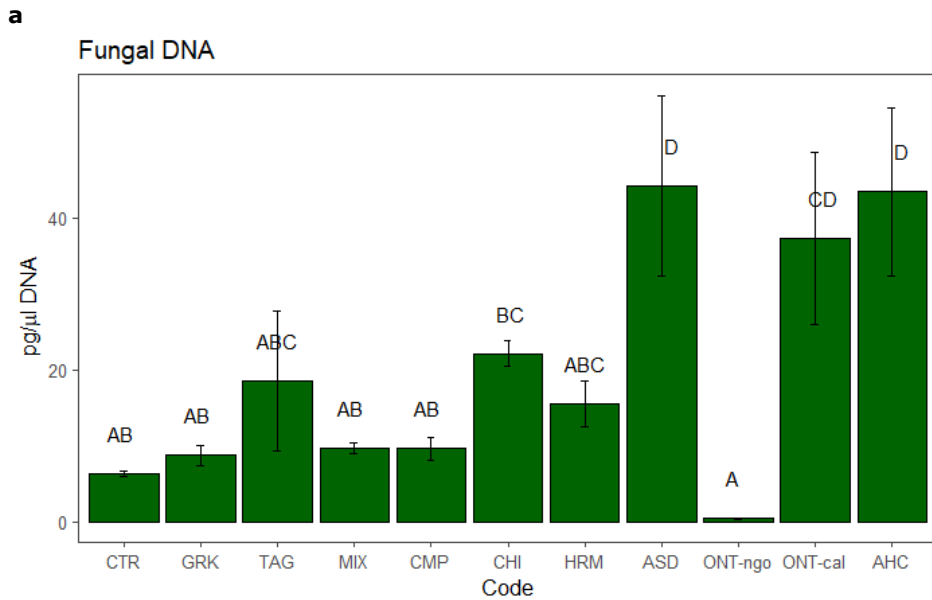


Fig. 3.11: Schimmel DNA concentratie in de verschillende behandelingen, gemeten met a) primers 5.8S-Fun en ITS4-Fun, b) Fierer primers.

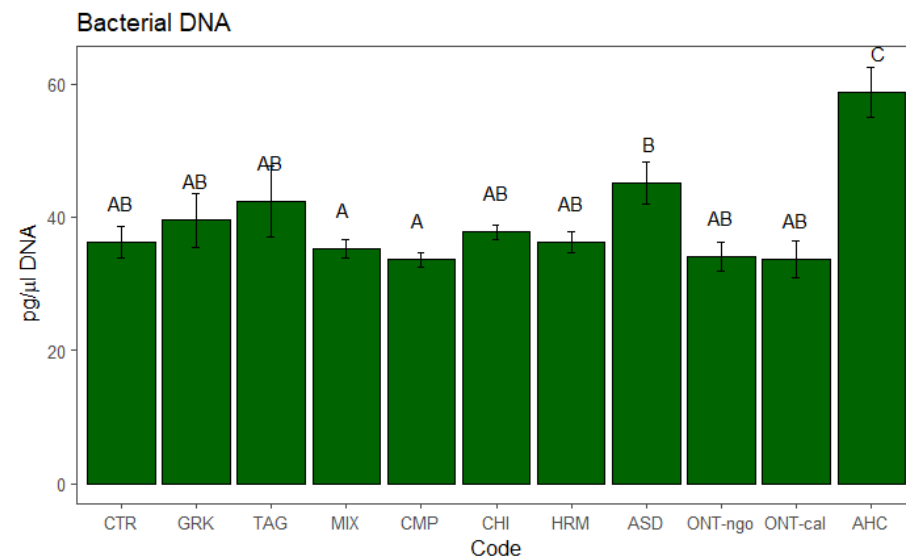


Fig. 3.12: Bacterie DNA concentratie in de verschillende behandelingen.

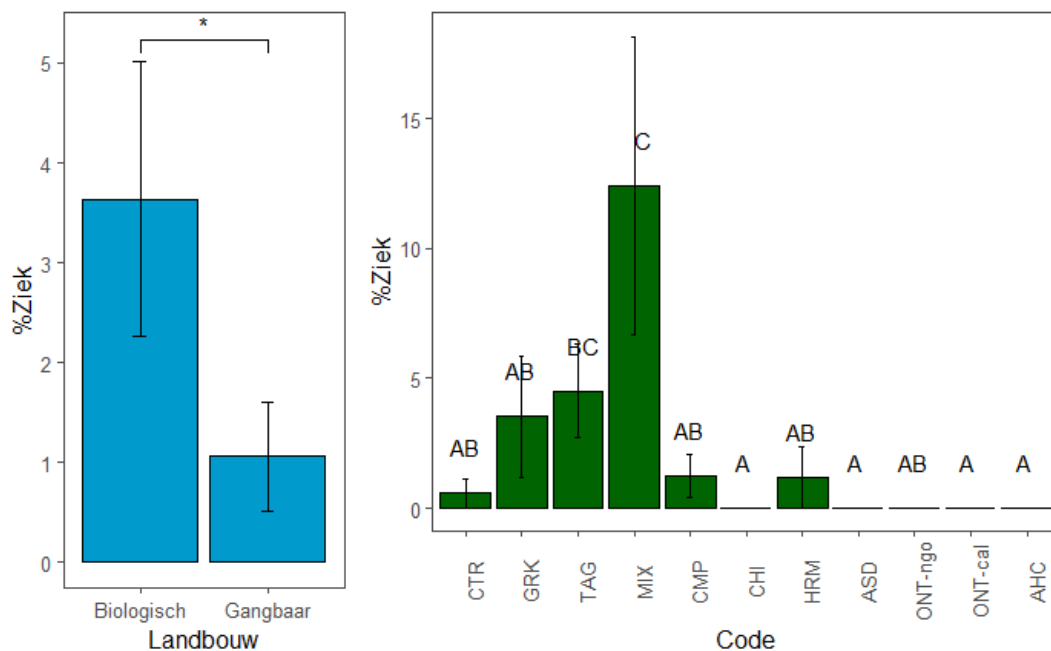
3.2 Biotoetsen

De biotoetsen zijn uitgevoerd in november 2018 en april 2019 voor zowel *Rhizoctonia solani* als *Pythium ultimum*.

3.2.1 Rhizoctonia 2018

Er was geen verschil in het aantal gekiemde planten tussen de landbouwsystemen of de behandelingen. De natuurlijke infectie met *Rhizoctonia* was hoger in het biologische systeem dan in het gangbare systeem ($F=5.37$, $p=0.02$) en verschilde significant tussen de behandelingen ($F=3.85$, $p<0.01$). De natuurlijke infectie was hoger in het groenbemestermengsel vergeleken met de controle (Fig. 3.13a). Na inoculatie met *Rhizoctonia* was de ziekte-incidentie in alle behandelingen hoog (Fig. 3.13 b). Alhoewel, de behandeling met groenbemestermengsel significant lager was dan de controle, was dit te wijten aan de correctie voor natuurlijke infectie. Er waren geen verschillen in totale infectie tussen behandelingen.

a



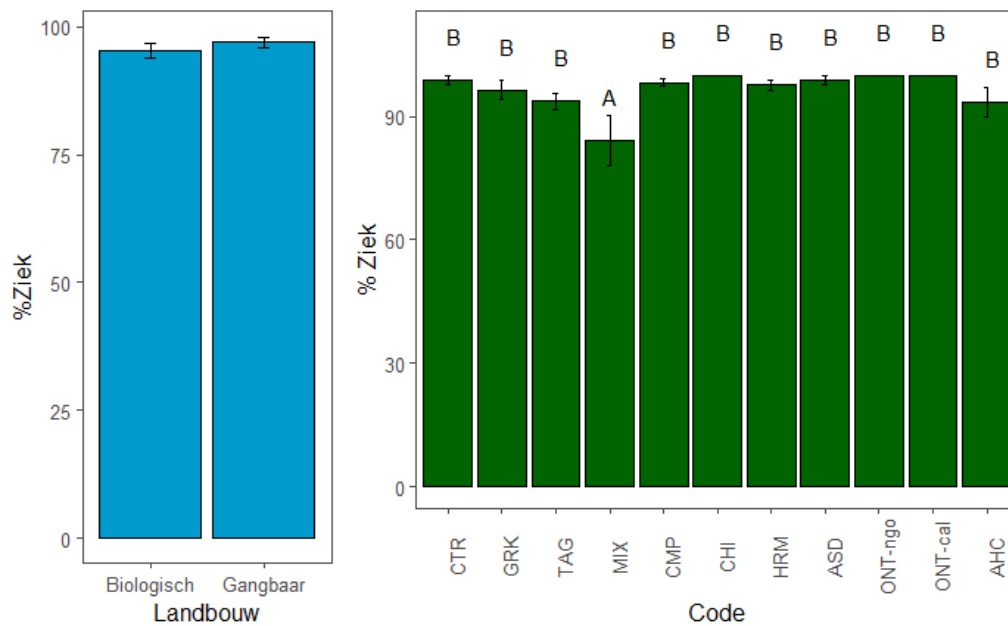
b

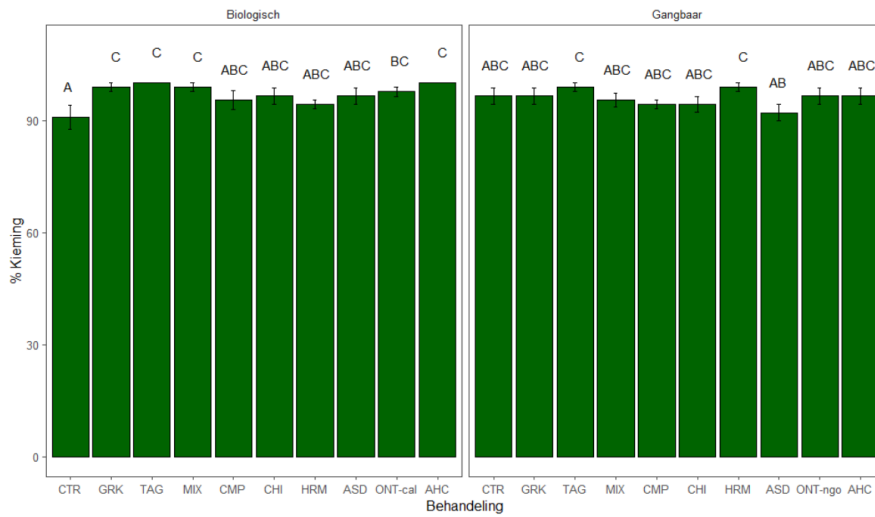
Fig. 3.13: Ziekte-incidentie in suikerbiet in 2018; a) natuurlijke infectie in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen, b) ziekte-incidentie na inoculatie met *Rhizoctonia* gemiddeld over landbouwsystemen en gecorrigeerd voor natuurlijke infectie.

3.2.2 Rhizoctonia 2019

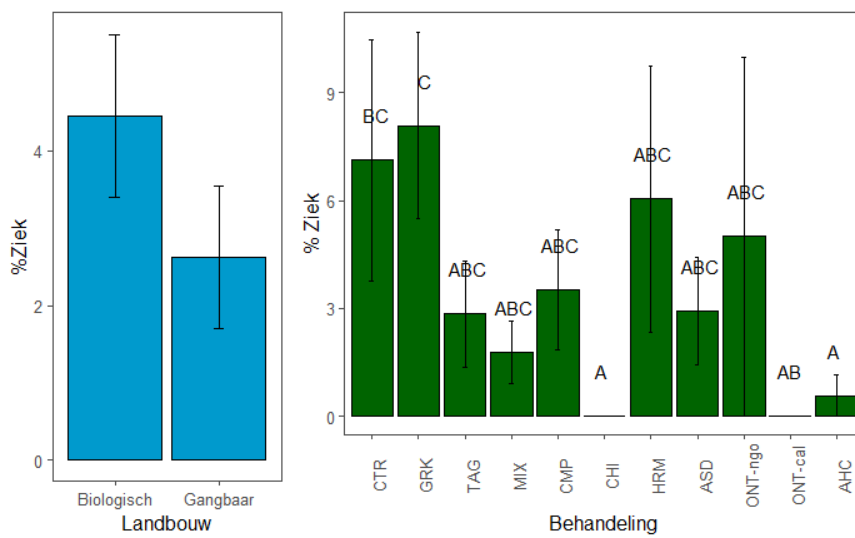
In 2019 was er een significant effect van de interactie van behandeling en landbouwsysteem op kieming ($\chi^2=34.10$, $p=0.02$). De gras-klover, tagetes, groenbemestermengsel, ONT-cal en combi behandeling toonden een hoger kiemingspercentage van suikerbiet vergeleken met de controle in de biologische landbouw (Fig. 3.14a). In het gangbare systeem was er alleen een hogere kieming bij tagetes en haarmeel in vergelijking tot anaerobe grondontsmetting.

De natuurlijke infectie verschilde niet significant tussen de twee landbouwsystemen maar ook hier werd wel een hogere infectiedruk gemeten in het biologische systeem. Tussen de behandelingen werden wel enkele significante verschillen gemeten ($\chi^2=18.51$, $p=0.05$), namelijk een lagere infectie in de chitine en combi behandeling dan in de controle en de grasklover behandeling (Fig. 3.14b). De ziekte-incidentie na inoculatie met *Rhizoctonia* (gecorrigeerd voor natuurlijk infectie) was voor chitine en de combi behandeling significant lager dan de controle en de grasklover behandeling (Fig. 3.14c). Dit is een indicatie dat chitine en de combibehandeling wel zorgen voor een verminderde ziektedruk in het veld, maar geen weerbaarheid veroorzaken. Ook bij de geïnoculeerde biotoetsen werd geen verschil tussen de landbouwsystemen gemeten.

a



b



c

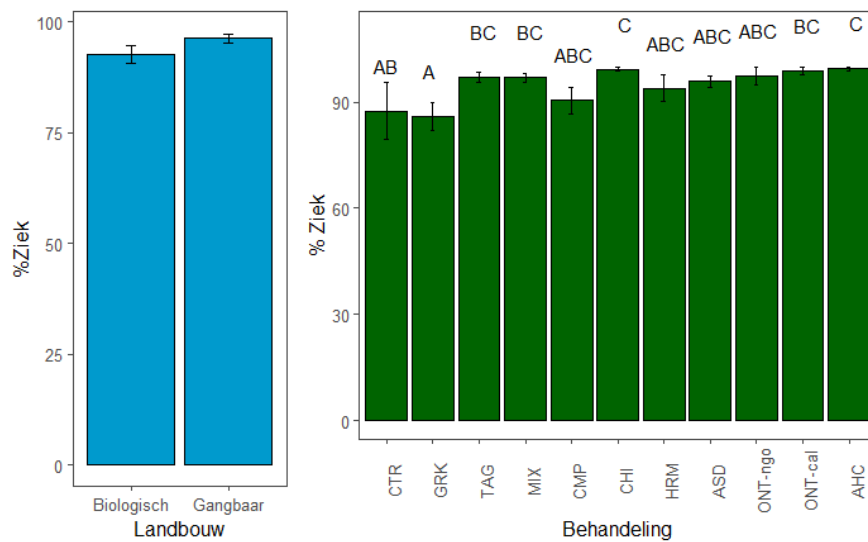
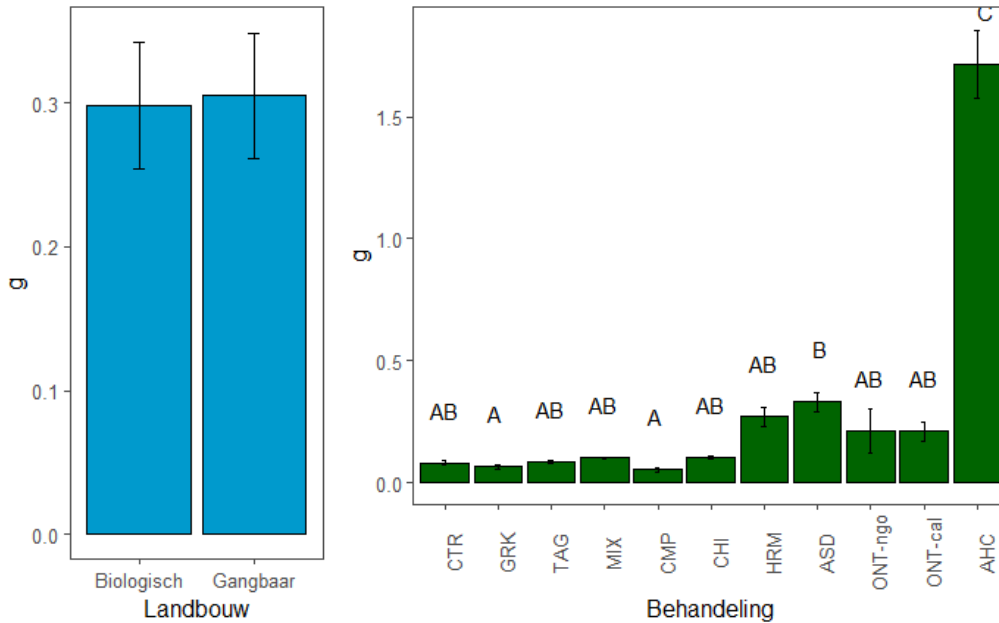


Fig. 3.14: Ziekte-incidentie in suikerbiet in 2019; a) kiemingspercentage in de verschillende behandelingen in interactie met landbouwsysteem; b) natuurlijke infectie in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen, c) ziekte-incidentie na inoculatie met *Rhizoctonia* in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen.

3.2.3 Pythium 2018 en 2019

In beide jaren was het versgewicht van tuinkers met of zonder toevoeging met *Pythium ultimum* duidelijk hoger in de combi-behandeling dan in de controle (Fig. 3.15) (2018 zonder P.: $\chi^2=250.25$, $p<0.01$, 2018 met P.: $\chi^2=120.94$, $p<0.01$, 2019 zonder P.: $\chi^2= 351.35$, $p<0.01$, 2019 met P.: $\chi^2= 185.74$, $p<0.01$). Tevens was de ziekte-incidentie met of zonder (natuurlijke infectie) toevoeging van *Pythium* lager in de combi-behandeling (Fig. 3.16) (2018 zonder P.: $\chi^2=324.70$, $p<0.01$, 2018 met P.: $\chi^2=286.56$, $p<0.01$, 2019 zonder P.: $\chi^2= 792.71$, $p<0.01$, 2019 met P.: $\chi^2= 521.84$, $p<0.01$).

a



b

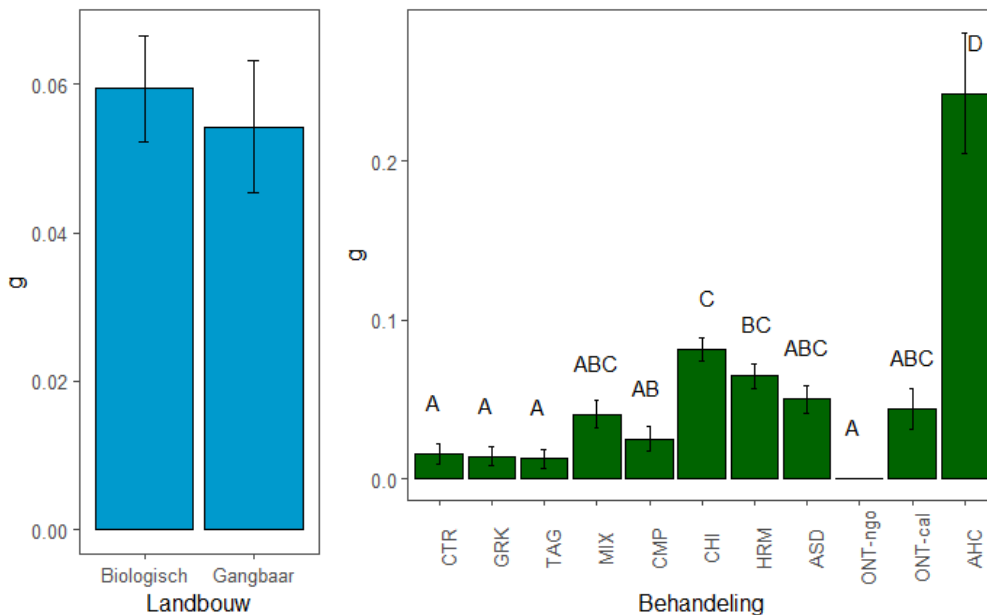
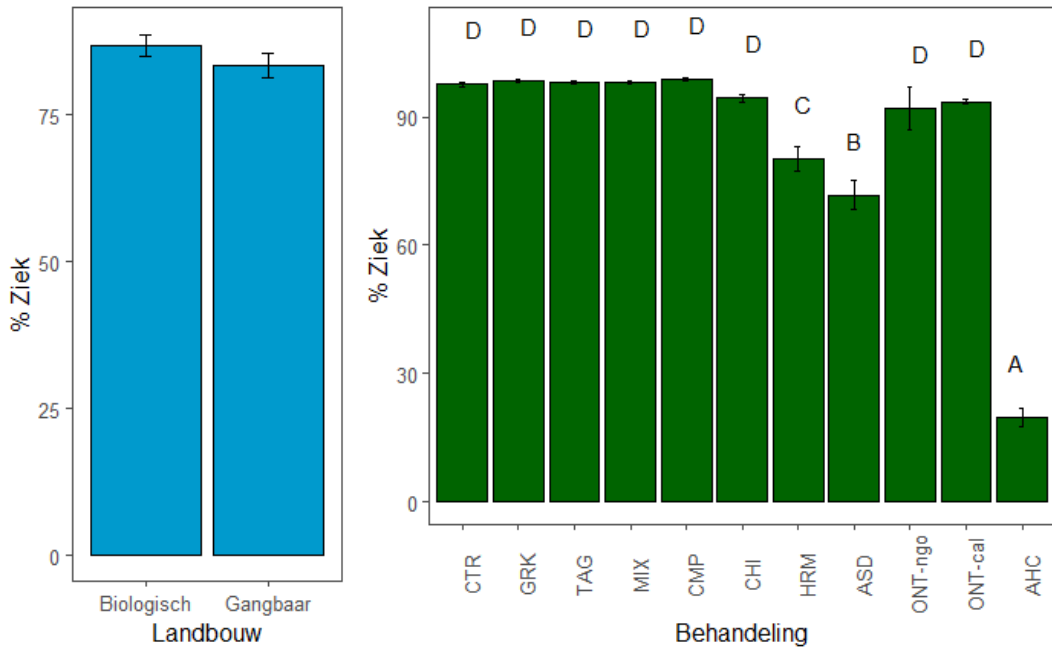


Fig. 3.15: Versgewicht van tuinkers in 2019 a) zonder inoculatie van *Pythium* in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen, b) na inoculatie van *Pythium* in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen.

a



b

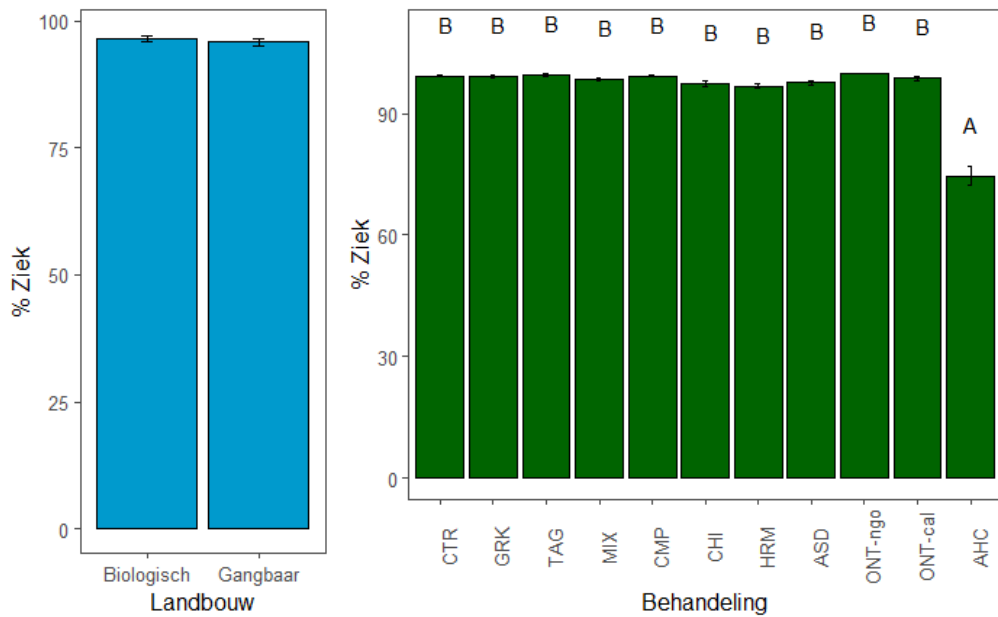


Fig. 3.16: Ziekte-incidentie in tuinkers in 2019; a) zonder inoculatie van *Pythium* in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen, b) na inoculatie van *Pythium* in de verschillende behandelingen en de twee landbouwsystemen.

3.3 PLFA

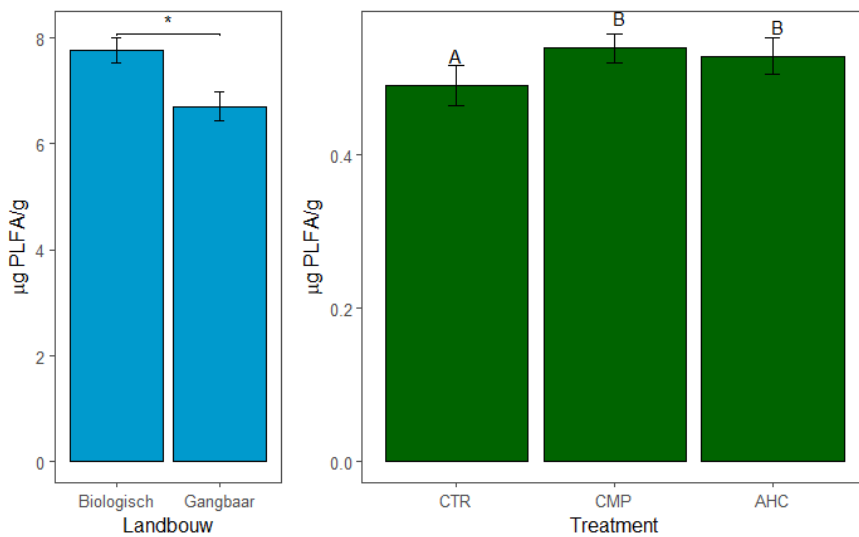
De PLFA analyse is uitgevoerd in Maart 2020.

Een groot aantal PLFAs was in hogere concentraties aanwezig in bodem van het biologische systeem: PLFAs voor Actinobacteria, AMF, microbiële biomassa (Fig. 3.17). Voor alle resultaten zie tabel 3.1. Verder verschilde de concentratie van veel PLFAs tussen de behandelingen. Voor de PLFAs van Actinobacteria, AMF, microbiële biomassa (Fig.3.17), AMF biomassa C, bacteriële biomassa C, totaal

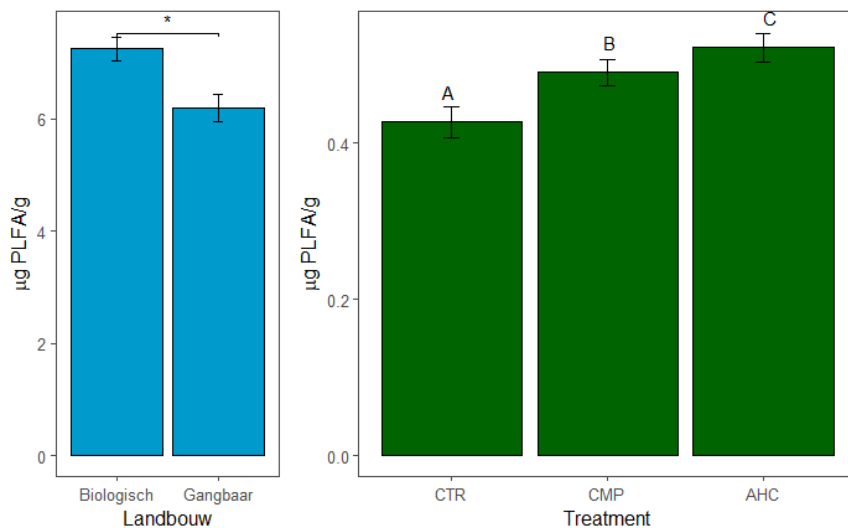
aantal bacteriën, de verhouding van Cy19:Precy19 vetzuren, *Desulfovibrio*, schimmel biomassa, resterende schimmels, biomassa C resterende schimmels, totaal aantal schimmels, gramnegatieve en grampositieve bacteriën, microbiële biomassa, microbiële biomassa C, mono-onverzadigde vetzuren, PMN, poly-onverzadigde vetzuren, protozoa, *Rhizobia* en verzadigde vetzuren, was de concentratie hoger in zowel de compost als de combi behandeling vergeleken met de controle. In de meeste gevallen bevatte de combi behandeling de hoogste concentratie aan vetzuren. De verhouding van PLFAs van grampositieve en gramnegatieve bacteriën was lager in beide behandelingen dan in de controle. De verhouding van verzadigde en onverzadigde vetzuren was lager in de compost behandeling dan in de controle en combi behandeling. De trans/cis verhouding van 16:1w7 en 18:1w7 waren slechts in de combi behandeling verhoogd (Tabel 3.1).

Een multivariate analyse laat zien dat microbiële biomassa C en bacteriële biomassa gecorreleerd is met de combi behandeling (Fig. 3.18). AMF en schimmelbiomassa zijn geassocieerd met de compost behandeling.

a



b



c

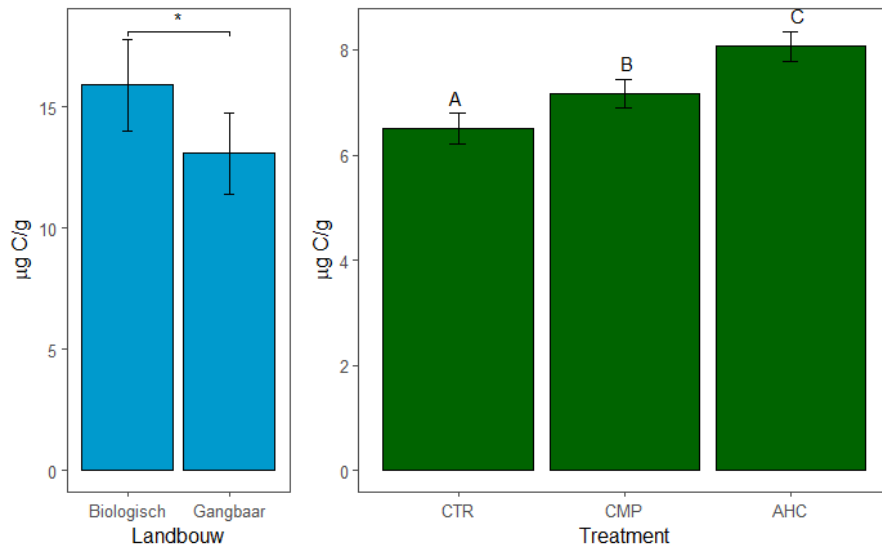


Fig. 3.17: Concentratie van PLFAs ($\mu\text{g/g}$ bodem) in de twee landbouwsystemen en de drie behandelingen voor a) Actinobacteria, b) AMF en c) microbiële biomassa.

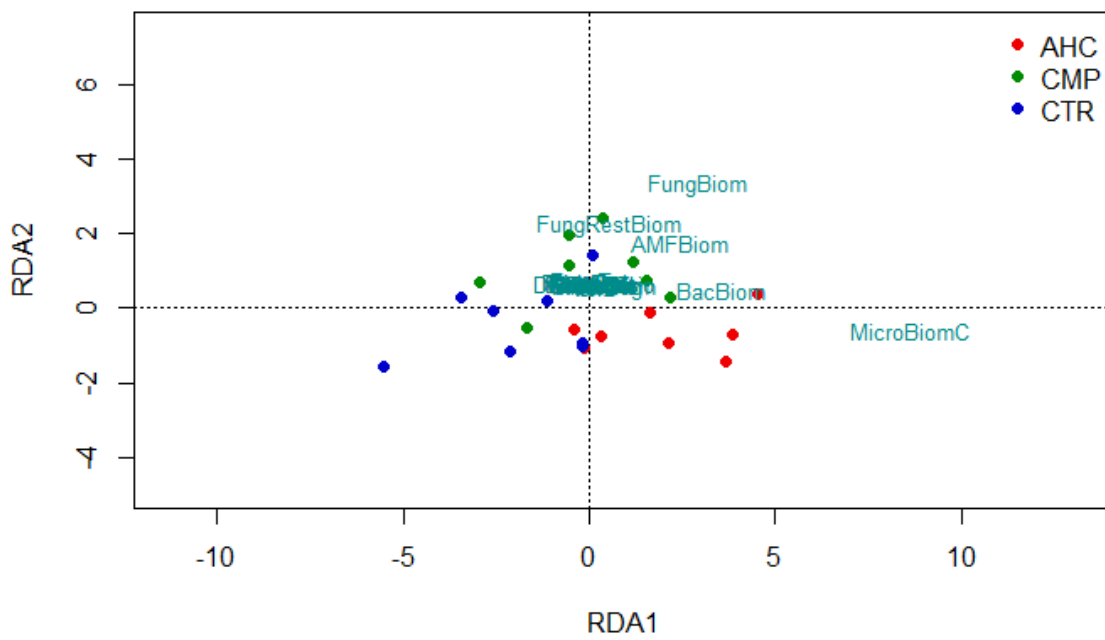


Fig. 3.18: Constrained RDA van alle PLFA resultaten; getoond worden de drie verschillende behandelingen en de gemeten parameters.

Tabel 3.1: Samenvatting van de concentratie van PLFAs in de drie behandelingen gemiddeld over landbouwsysteem; verschillende letters in "Group" staan voor significante verschillen tussen de behandelingen.

Variable	Code	mean	sd	se	ci	Group
Actinobacteria (µg PLFA/g)	AHC	0.528	0.068	0.024	0.057	B
Actinobacteria (µg PLFA/g)	CMP	0.539	0.055	0.019	0.046	B
Actinobacteria (µg PLFA/g)	CTR	0.490	0.074	0.026	0.062	A
AMF (µg PLFA/g)	AHC	0.523	0.052	0.018	0.044	C
AMF (µg PLFA/g)	CMP	0.490	0.047	0.017	0.039	B
AMF (µg PLFA/g)	CTR	0.427	0.057	0.020	0.048	A
AMF Biomassa C (µg C/g)	AHC	50.683	5.053	1.786	4.224	C
AMF Biomassa C (µg C/g)	CMP	47.554	4.571	1.616	3.821	B
AMF Biomassa C (µg C/g)	CTR	41.419	5.556	1.964	4.645	A
Bacteriële Biomassa C (µg C/g)	AHC	70.737	7.243	2.561	6.055	C
Bacteriële Biomassa C (µg C/g)	CMP	63.351	6.698	2.368	5.599	B
Bacteriële Biomassa C (µg C/g)	CTR	57.395	7.539	2.666	6.303	A
Totaal aantal bacteriën (µg PLFA/g)	AHC	7.446	0.762	0.270	0.637	C
Totaal aantal bacteriën (µg PLFA/g)	CMP	6.669	0.705	0.249	0.589	B
Totaal aantal bacteriën (µg PLFA/g)	CTR	6.042	0.793	0.281	0.663	A
Cy19:Precy19	AHC	0.022	0.007	0.003	0.006	B
Cy19:Precy20	CMP	0.021	0.004	0.001	0.003	B
Cy19:Precy21	CTR	0.016	0.005	0.002	0.005	A
<i>Desulfovibrio</i> (µg PLFA/g)	AHC	2.664	0.257	0.091	0.215	C
<i>Desulfovibrio</i> (µg PLFA/g)	CMP	2.387	0.253	0.089	0.212	B
<i>Desulfovibrio</i> (µg PLFA/g)	CTR	2.190	0.287	0.102	0.240	A
Schimmels:bacteriën	AHC	0.904	0.026	0.009	0.022	A
Schimmels:bacteriën	CMP	0.987	0.057	0.020	0.047	C
Schimmels:bacteriën	CTR	0.928	0.047	0.017	0.040	B
Schimmel Biomassa C (µg C/g)	AHC	63.869	6.374	2.254	5.329	B
Schimmel Biomassa C (µg C/g)	CMP	62.367	6.133	2.168	5.127	B
Schimmel Biomassa C (µg C/g)	CTR	53.247	7.628	2.697	6.377	A
Resterende schimmels (µg PLFA/g)	AHC	0.419	0.047	0.017	0.039	B
Resterende schimmels (µg PLFA/g)	CMP	0.470	0.065	0.023	0.054	C
Resterende schimmels (µg PLFA/g)	CTR	0.376	0.071	0.025	0.060	A
Resterende schimmels Biomassa C (µg C/g)	AHC	13.187	1.473	0.521	1.231	B
Resterende schimmels Biomassa C (µg C/g)	CMP	14.813	2.053	0.726	1.716	C
Resterende schimmels Biomassa C (µg C/g)	CTR	11.828	2.246	0.794	1.878	A
Totaal aantal schimmels (µg PLFA/g)	AHC	0.941	0.096	0.034	0.080	B
Totaal aantal schimmels (µg PLFA/g)	CMP	0.961	0.103	0.036	0.086	B
Totaal aantal schimmels (µg PLFA/g)	CTR	0.803	0.125	0.044	0.105	A
Gramnegatieve bacteriën (µg PLFA/g)	AHC	4.512	0.501	0.177	0.419	C
Gramnegatieve bacteriën (µg PLFA/g)	CMP	3.980	0.434	0.153	0.363	B
Gramnegatieve bacteriën (µg PLFA/g)	CTR	3.595	0.501	0.177	0.419	A

grampositieve:gramnegatieve bacteriën	AHC	0.652	0.020	0.007	0.017	A
grampositieve:gramnegatieve bacteriën	CMP	0.676	0.014	0.005	0.012	B
grampositieve:gramnegatieve bacteriën	CTR	0.683	0.022	0.008	0.018	C
Grampositieve bacteriën (µg PLFA/g)	AHC	2.934	0.266	0.094	0.222	C
Grampositieve bacteriën (µg PLFA/g)	CMP	2.688	0.274	0.097	0.229	B
Grampositieve bacteriën (µg PLFA/g)	CTR	2.447	0.296	0.105	0.248	A
Microbiële biomassa (µg PLFA/g)	AHC	8.062	0.822	0.291	0.687	C
Microbiële Biomassa (µg PLFA/g)	CMP	7.155	0.763	0.270	0.638	B
Microbiële Biomassa (µg PLFA/g)	CTR	6.498	0.823	0.291	0.688	A
Microbiële Biomassa C (µg C/g)	AHC	173.333	17.677	6.250	14.778	C
Microbiële Biomassa C (µg C/g)	CMP	153.840	16.416	5.804	13.724	B
Microbiële Biomassa C (µg C/g)	CTR	139.714	17.690	6.254	14.789	A
mono:poly onverzadigd	AHC	5.093	0.329	0.116	0.275	C
mono:poly onverzadigd	CMP	4.300	0.411	0.145	0.344	A
mono:poly onverzadigd	CTR	4.794	0.412	0.146	0.344	B
Mono onverzadigd (µg PLFA/g)	AHC	2.879	0.279	0.099	0.233	C
Mono onverzadigd (µg PLFA/g)	CMP	2.600	0.263	0.093	0.220	B
Mono onverzadigd (µg PLFA/g)	CTR	2.366	0.302	0.107	0.252	A
PMN (mg N/kg)	AHC	17.625	6.093	2.154	5.094	B
PMN (mg N/kg)	CMP	15.500	3.505	1.239	2.930	B
PMN (mg N/kg)	CTR	10.375	6.844	2.420	5.722	A
Poly onverzadigd (µg PLFA/g)	AHC	0.568	0.071	0.025	0.059	B
Poly onverzadigd (µg PLFA/g)	CMP	0.610	0.083	0.029	0.069	C
Poly onverzadigd (µg PLFA/g)	CTR	0.499	0.089	0.032	0.075	A
Protozoa (µg PLFA/g)	AHC	0.085	0.015	0.005	0.013	C
Protozoa (µg PLFA/g)	CMP	0.074	0.010	0.004	0.008	B
Protozoa (µg PLFA/g)	CTR	0.065	0.009	0.003	0.008	A
<i>Rhizobia</i> (µg PLFA/g)	AHC	1.249	0.183	0.065	0.153	C
<i>Rhizobia</i> (µg PLFA/g)	CMP	1.089	0.169	0.060	0.141	B
<i>Rhizobia</i> (µg PLFA/g)	CTR	0.956	0.155	0.055	0.130	A
Verzadigd (µg PLFA/g)	AHC	3.413	0.244	0.086	0.204	C
Verzadigd (µg PLFA/g)	CMP	3.013	0.252	0.089	0.211	B
Verzadigd (µg PLFA/g)	CTR	2.850	0.277	0.098	0.232	A
Verzadigd:onverzadigd	AHC	0.993	0.050	0.018	0.042	B
Verzadigd:onverzadigd	CMP	0.941	0.034	0.012	0.028	A
Verzadigd:onverzadigd	CTR	1.000	0.055	0.020	0.046	B
16:1w7-t/c	AHC	0.057	0.013	0.005	0.011	B
16:1w7-t/c	CMP	0.032	0.008	0.003	0.007	A
16:1w7-t/c	CTR	0.035	0.009	0.003	0.008	A
18:1w7-t/c	AHC	0.043	0.008	0.003	0.007	B
18:1w7-t/c	CMP	0.031	0.006	0.002	0.005	A
18:1w7-t/c	CTR	0.029	0.006	0.002	0.005	A

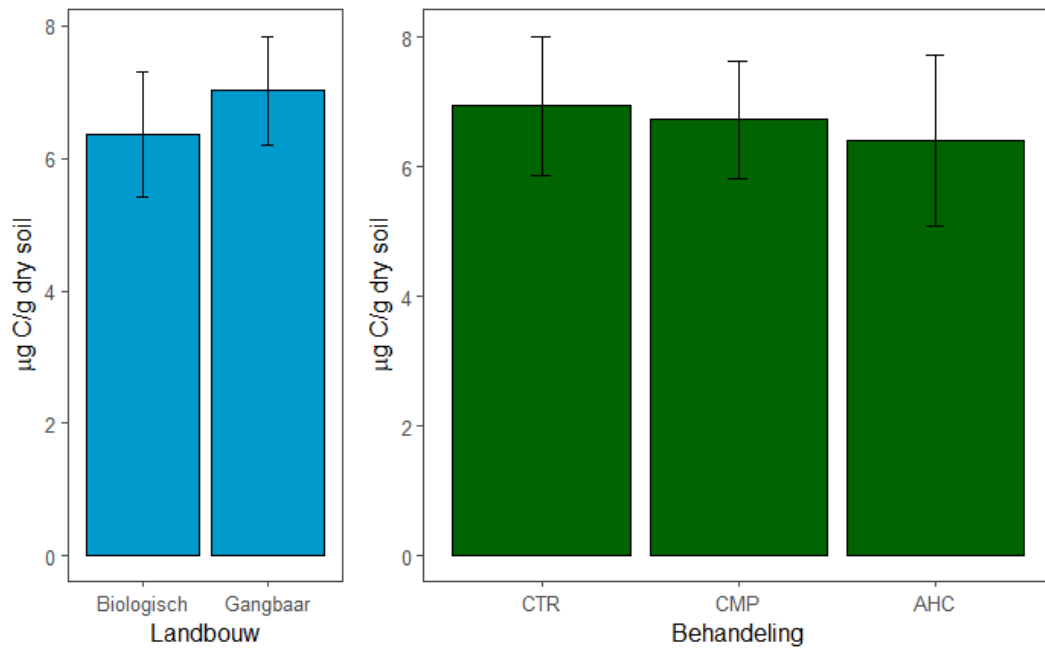
3.4 Microbiële biomassa

Microbiële biomassa is gemeten in maart 2020.

Schimmel biomassa (Fig. 3.19a), actieve schimmels, bacteriële biomassa (Fig. 3.19b), het aantal cellen, cel volume, lengte: breedte verhouding, celdeling, ongekleurde schimmels (inactief) en de schimmel: bacterie verhouding verschilden niet significant tussen de landbouwsystemen en behandelingen.

Er was geen significante correlatie tussen de bacteriële biomassa en schimmelbiomassa van de microscopische meting en de PLFA meting.

a



b

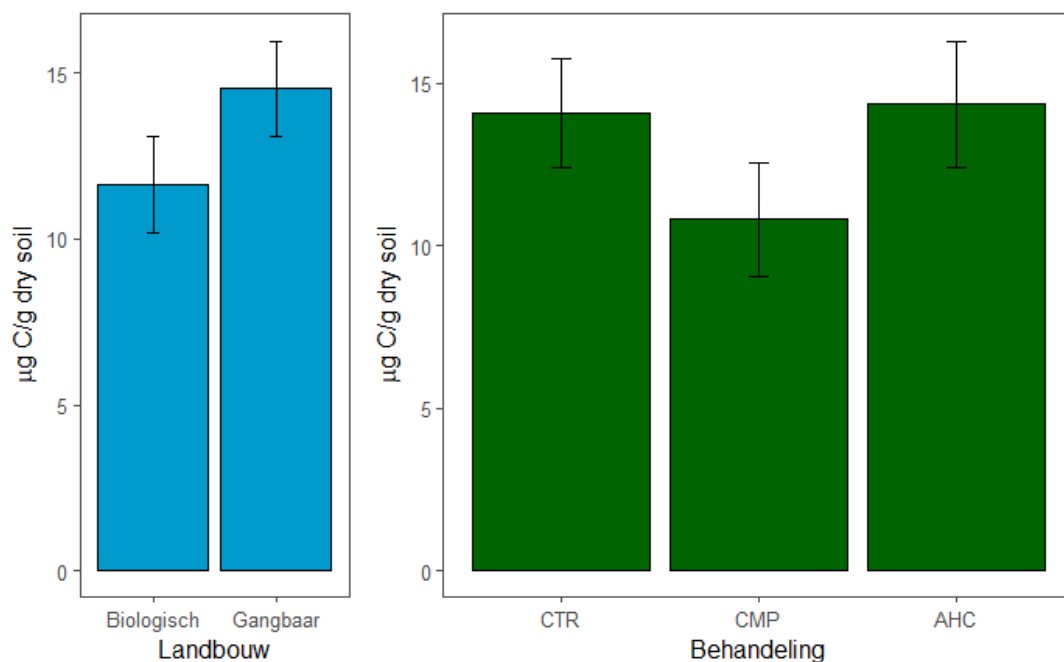


Fig. 3.19: a) Schimmel biomassa en b) bacterie biomassa gemiddeld in de twee landbouwsystemen en de drie behandelingen.

3.5 HWC en PMN

HWC is gemeten in maart 2019 in alle behandelingen en in maart 2020 in de behandelingen CTR, CMP en AHC. PMN is gemeten in 2020 in CTR, CMP en AHC.

In 2019 was HWC 15% hoger in het biologische landbouwsysteem dan het gangbare systeem, maar dit verschil was niet significant. Er was echter een significant effect van behandeling ($\chi^2=139.25$, $p<0.01$). In beide systemen bevatten de behandelingen mix, compost en chitine significant meer HWC dan de controle (Fig. 3.20). ASD leverde nog hogere HWC waarden, en de combinatie behandeling (AHC) bevatte het meeste HWC. Chemisch Ontsmetten met Metamnatrium (Monam) gaf de laagste HWC waarden, terwijl biologisch ontsmetten met Caliente een veel hogere HWC achter liet. Ook in 2020 was er geen significant verschil in HWC tussen het biologische en gangbare systeem en was verhoogd in de compost behandeling en het hoogst in de combi behandeling (Fig. 3.21a). Voor PMN was hetzelfde patroon zichtbaar (Fig. 3.21b).

Er was geen significante correlatie tussen schimmel of bacteriële biomassa gemeten met de microscopische methode en PMN of HWC. Echter waren er significante positieve correlaties tussen bacteriële PLFAs (respectievelijk: $\rho=0.70$, $p<0.01$; $\rho=0.83$, $p<0.01$) en zowel HWC als PMN en schimmel PLFAs en HWC en PMN (respectievelijk: $\rho=0.66$, $p<0.01$; $\rho=0.60$, $p<0.01$) (Fig. 3.22).

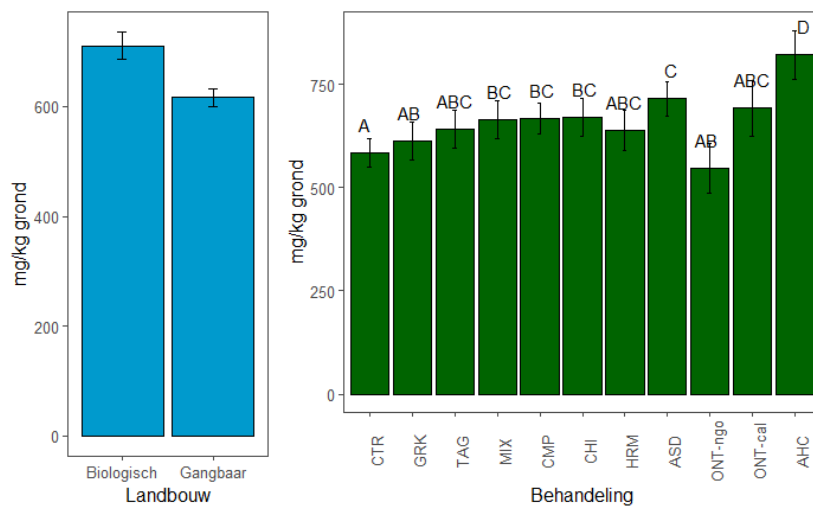
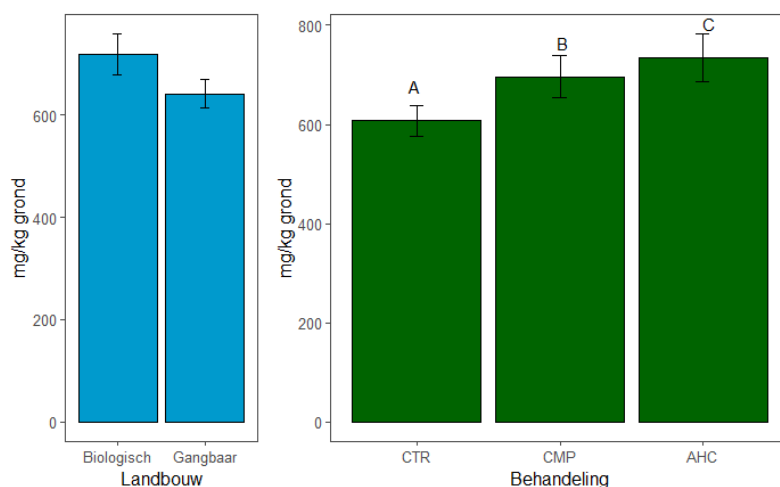


Fig. 3.20: HWC in de twee landbouwsystemen en de verschillende behandelingen gemiddeld over het biologische en gangbare landbouwsysteem in 2019.

a



b

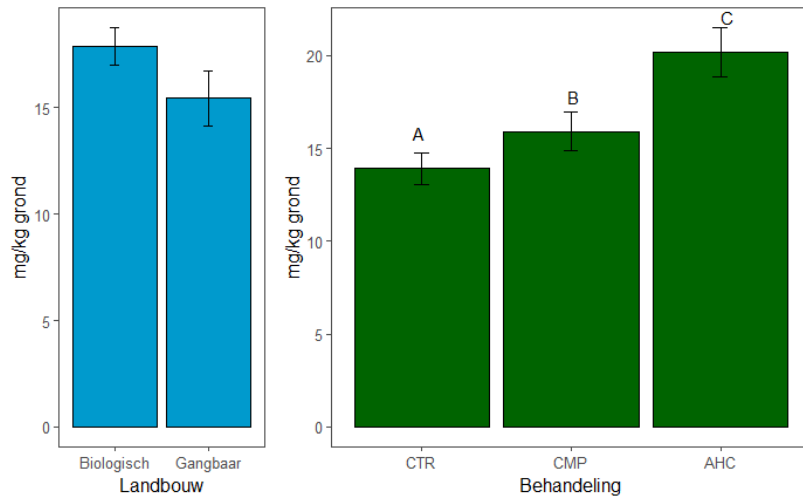
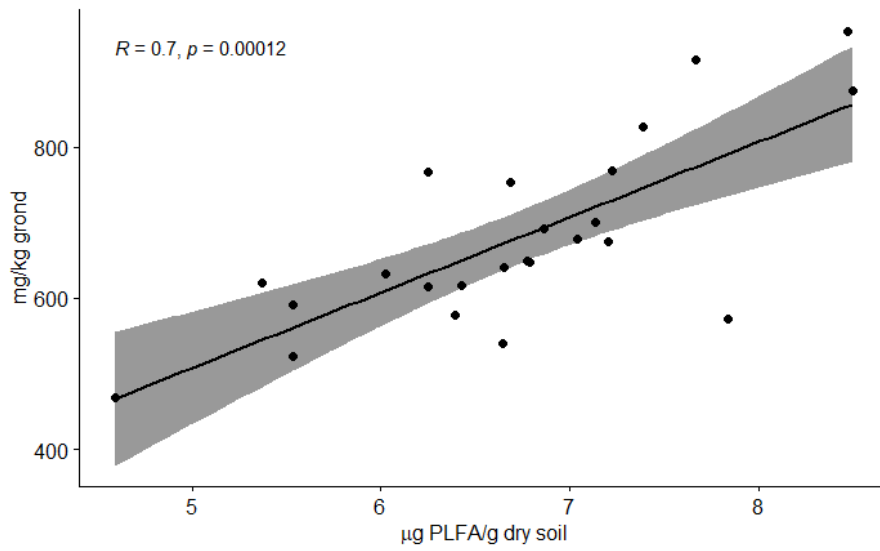
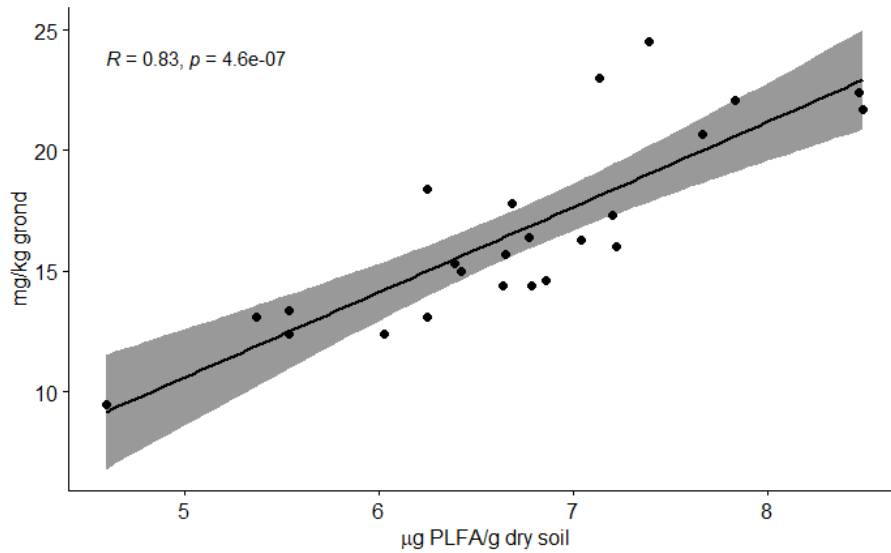


Fig. 3.21: a) HWC en b) PMN in de twee landbouwsystemen en de drie behandelingen in 2020.

a



b



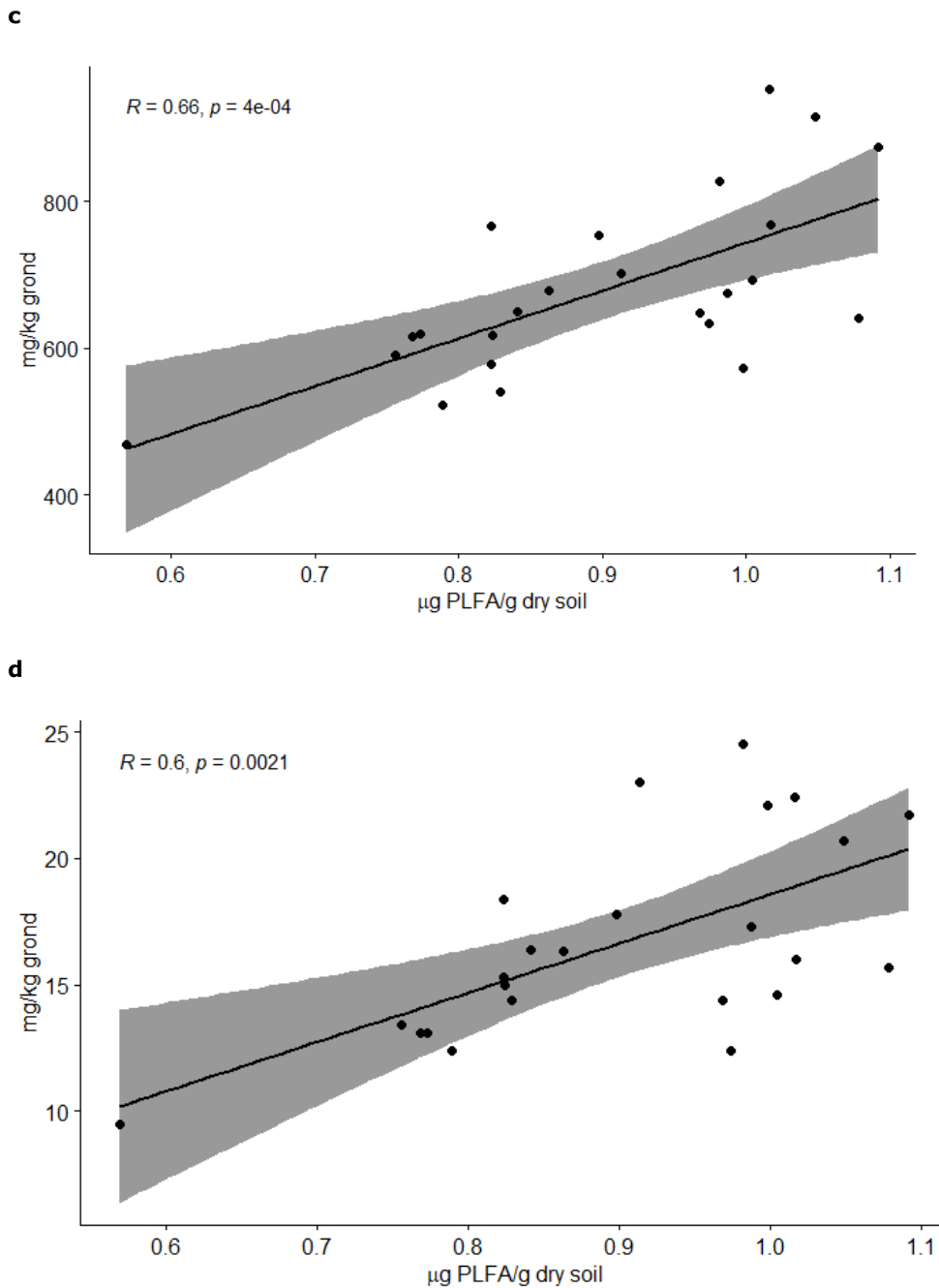


Fig. 3.22: Correlatie tussen a) HWC en bacteriële PLFA, b) PMN en bacteriële PLFA, c) HWC en schimmel PLFA en d) PMN en schimmel PLFA.

3.6 Bodemrespiratie en Microresp

De bodemrespiratie en microresp zijn in maart 2020 gemeten. In CTR, CMP en AHC De bodemrespiratie ging omlaag in de tijd ($\chi^2 = 22376.3, p < 0.01$), maar was op alle tijdstippen significant hoger in de combinatie behandeling vergeleken met de controle ($\chi^2 = 117.9, p < 0.01$). Er was geen significant verschil tussen de compost behandeling en de controle (Fig. 3.23a). Er was ook een effect van landbouwsysteem ($\chi^2 = 20.5, p = 0.04$). Op tijdstip 120 (min), was bodemrespiratie hoger in het biologische systeem dan in het gangbare systeem (Fig. 3.23b). Voor de microresp data was er een interactie tussen landbouwsysteem en behandeling in het effect op de basale respiratie (water) ($\chi^2 = 8.56, p = 0.01$), wat betekent dat het effect van de behandelingen verschilde tussen de landbouwsystemen. Er zijn geen paarsgewijze significante verschillen gevonden.

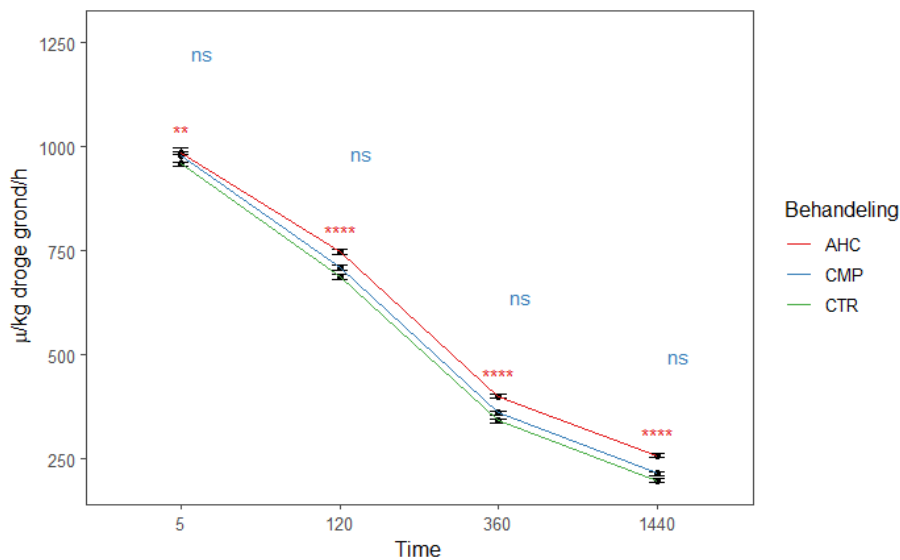
Voor de microresp data zijn de relatieve waardes berekend door te delen door de som van alle microresp waardes (van alle substraten) per monster.

De respiratie na toevoegen van de substraten lignine, N-acetylglucosamine en glucose werd beïnvloed door zowel landbouw als de behandelingen. Alanine verschilde slechts tussen de twee landbouwsystemen en appelzuur verschilde tussen de behandelingen.

Voor lignine was de respiratie hoger in de compost behandeling vergeleken met de controle (Fig. 3.24). Dit was echter slechts het geval in het biologische landbouwsysteem.

De respiratie van N-acetylglucosamine was hoger in het gangbare dan in het biologische landbouwsysteem (Fig. 3.25a). Voor beide landbouwsystemen toonde de combinatiebehandeling een lagere respiratie dan de controle en de compost behandeling (Fig. 3.24b). In beide systemen lag voor glucose de combi behandeling lager dan de controle en in het biologische systeem lag ook de compost behandeling significant lager (Fig. 3.26). De respiratie van alanine was lager in het biologische systeem dan in het gangbare systeem ($\chi^2=5.10$, $p=0.02$) (Fig. 3.27). De respiratie van appelzuur lag zowel in de compost als de combibehandeling lager dan de controle ($\chi^2= 13.80$, $p<0.01$) (Fig. 3.28). Er was geen verschil in MSIR (multiple substrate induced respiration) tussen de landbouwsystemen of behandelingen (Fig. 3.28).

a



b

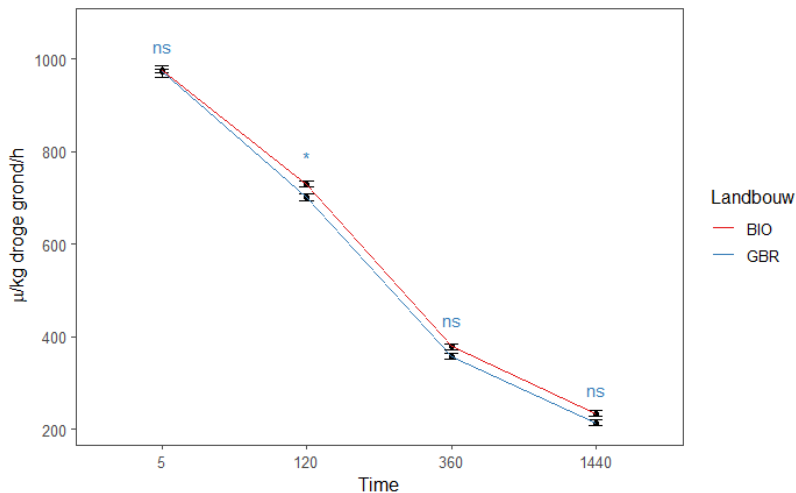


Fig. 3.23: Potentiële bodemrespiratie ($\mu\text{g C/kg droge grond/u}$) in de loop van de tijd (min) in a) de behandelingen controle (CTR), compost (CMP) en combinatiebehandeling (AHC), met significantie van de verschillen tussen compost (blauw) en controle en tussen de combinatiebehandeling (rood) en de controle en b) landbouw, met significantie in blauw.

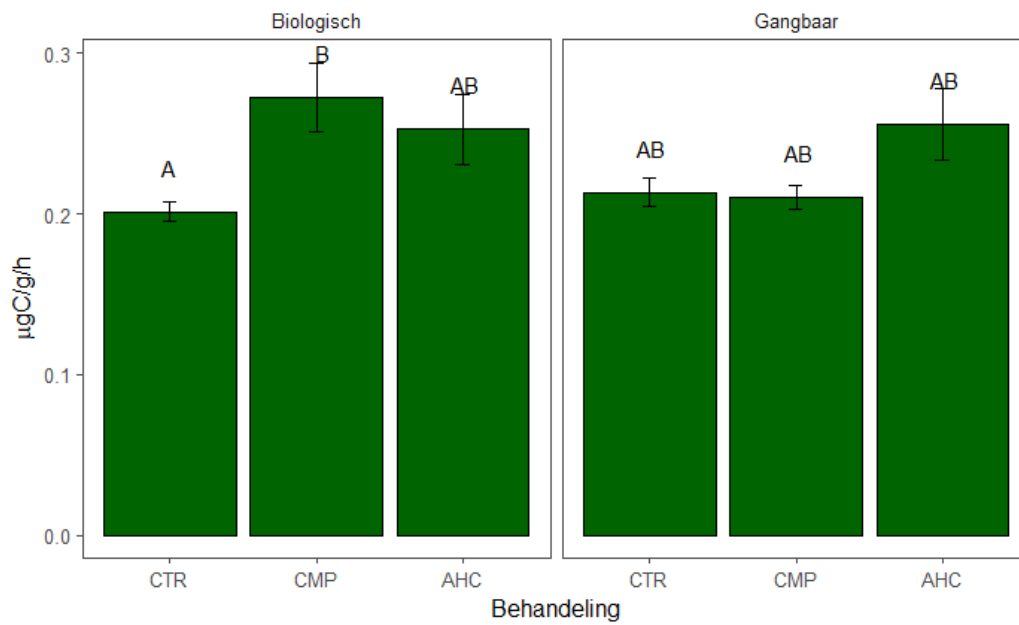


Fig. 3.24: Respiratie data van een Microresp toets voor lignine in de twee landbouwsystemen en drie behandelingen.

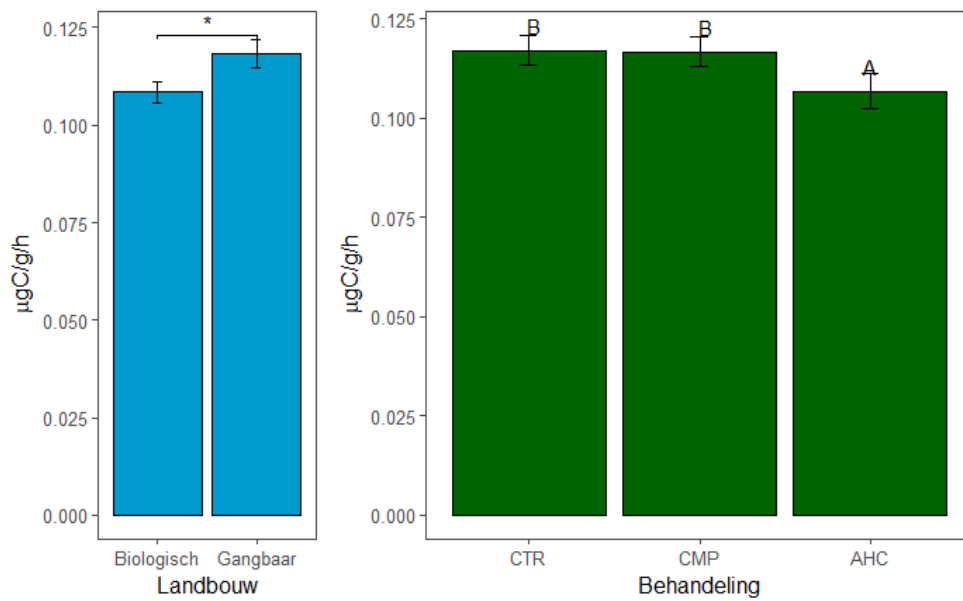


Fig. 3.25: Respiratie data van een Microresp toets voor N-acetyl glucosamine in de twee landbouwsystemen en drie behandelingen.

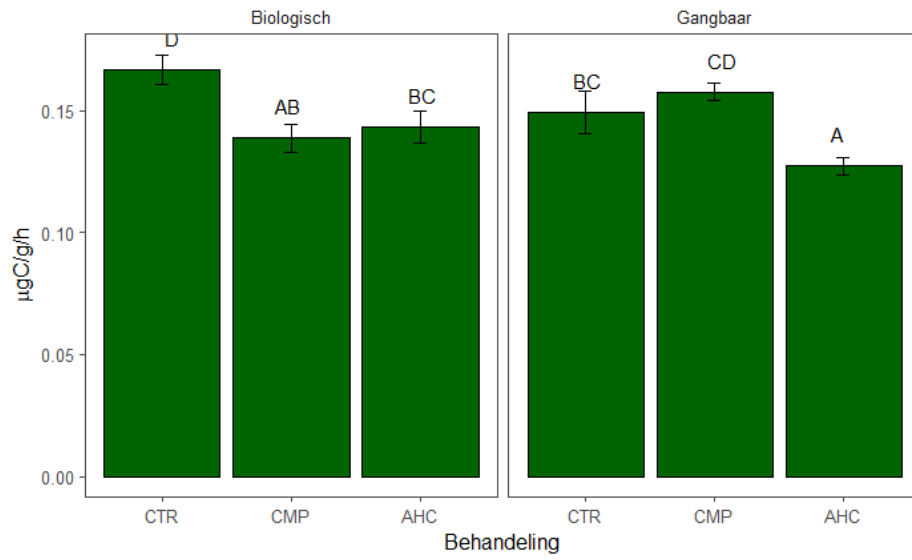


Fig. 3.26: Respiratie data van een Microresp toets voor glucose in drie behandelingen per landbouwsysteem.

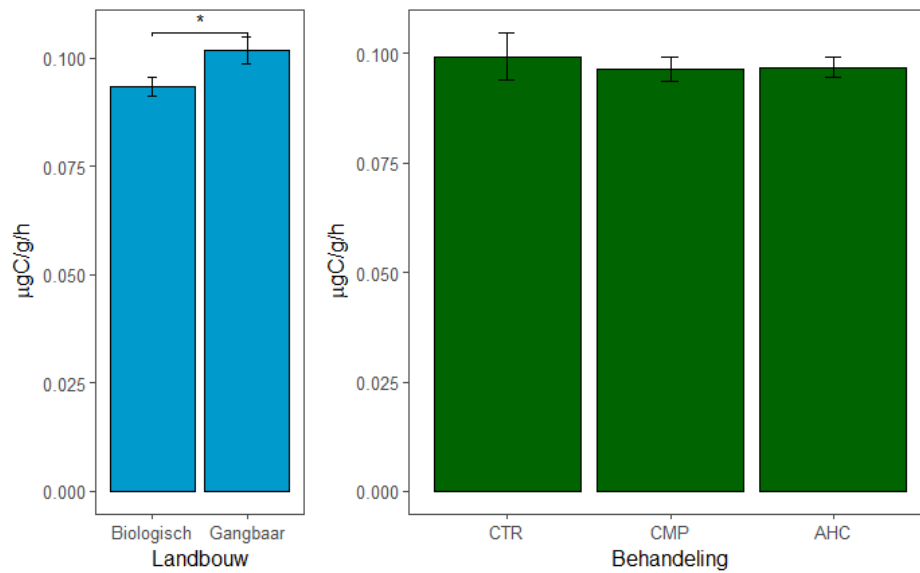


Fig. 3.27: Respiratie data van een Microresp toets voor alanine in de twee landbouwsystemen en de drie behandelingen.

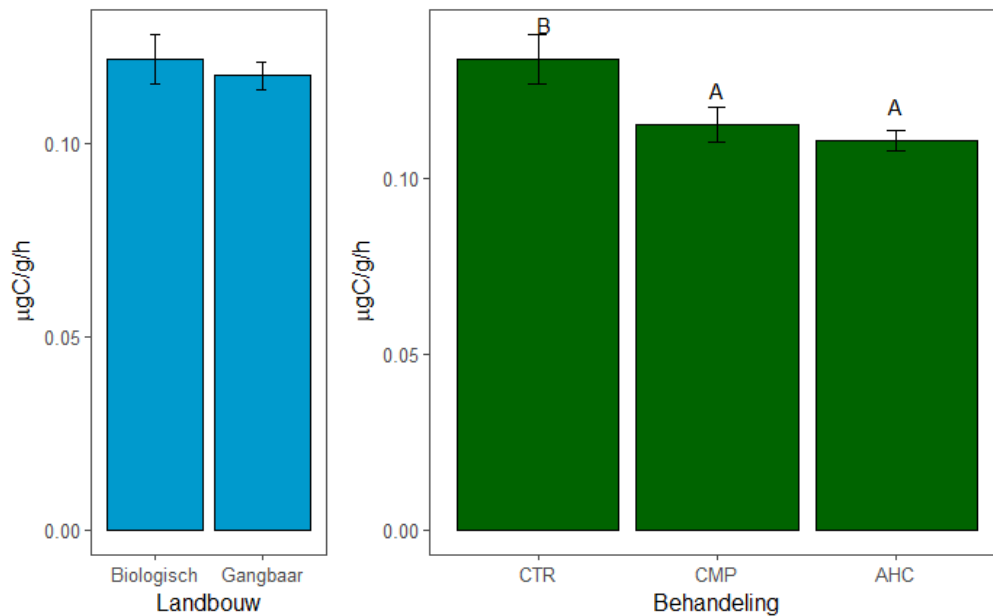


Fig. 3.28: Respiratie data van een Microresp toets voor appelzuur in de twee landbouwsystemen en drie behandelingen.

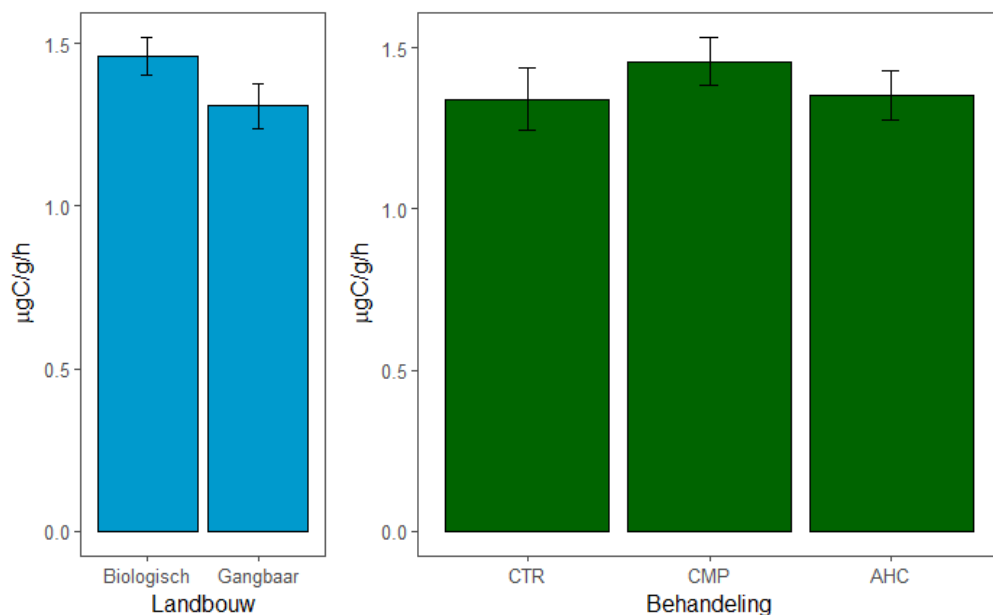


Fig. 3.29: MSIR in de twee landbouwsystemen en de drie behandelingen.

3.7 Bodemvruchtbaarheidsdata

Bodemvruchtbaarheid is gemeten in maart 2020.

Voor veel parameters was er een effect van landbouwsysteem of behandeling, maar geen interactie tussen de twee.

Bodemvruchtbaarheids-parameters die significant verhoogd waren in het biologische systeem zijn: K bezetting CEC, K bodemvoorraad, K plantbeschikbaar, N leverbaar, P-AI, P plantbeschikbaar, Pw en S leverbaar (Bijlage 1, Tabel 1). Dus kan worden gesteld dat er in bodem in het biologische landbouwsysteem de concentraties van K en P hoger zijn, mogelijk als gevolg van een hogere gift organische mest. Parameters die significant verlaagd waren in het biologische systeem zijn: anorganische C, C:N, C:S en H bezetting.

Een aantal parameters was significant verhoogd in de combi behandeling vergeleken met de controle. Dit zijn B plantbeschikbaar, Co plantbeschikbaar, Cu plantbeschikbaar, Mn plantbeschikbaar, P

plantbeschikbaar, Zn plantbeschikbaar, K plantbeschikbaar, organische C, N leverbaar, organische stof, S leverbaar en S totaal (Bijlage 1, Tabel 2). Parameters die verhoogd waren in de compost behandeling zijn: B plantbeschikbaar, Ca bodemvoorraad, Ca voorraad, organische C, K plantbeschikbaar, organische stof en S totaal. Mg plantbeschikbaar en pH waren significant verminderd in de combibehandeling. Alle resultaten zijn te vinden in bijlage 1.

4 Discussie en Conclusies

4.1 Microbioom (November 2018)

Door het bodemmicrobioom te meten kan een indruk worden gekregen van de soortsaanpak en diversiteit aan bodemmicroorganismen, en of deze beïnvloed zijn door de maatregelen. Door deze data te vergelijken met de overige resultaten kan een beter begrip ontstaan m.b.t. de effecten van de maatregelen en de mogelijke gevolgen op de plantengroei, bodemweerbaarheid en andere functionele aspecten van de bodem. Daarnaast kunnen microbiom data ook wijzen op bepaalde indicatorsoorten of groepen die indicatief zijn voor of ziekte of weerbaarheid. Data verkregen van één jaar kan echter slechts een indicatie leveren van het microbiom op dit tijdstip.

De Shannon diversiteits-index van zowel schimmels als bacteriën verschilde duidelijk tussen de behandelingen, maar niet tussen gangbare en biologische landbouw. Een groot aantal studies heeft wel een hogere diversiteit in biologische landbouwsystemen gevonden, maar dit was niet altijd het geval (Bonanomi, et al., 2016, Hartmann, et al., 2015). Wel vond een eerdere studie in 2013 van dezelfde percelen een significant hogere bacteriële diversiteit in het biologische systeem (Lupatini, et al., 2017). In een gewasrotatie met variabele weersomstandigheden hebben jaareffecten waarschijnlijk een grote invloed op de microbiële gemeenschappen. In deze studie lieten vooral behandelingen met grondontsmetting een reductie zien in diversiteit, wat te verklaren is door een selectiedruk van de behandelingen op vele soorten schimmels en bacteriën (Poret-Peterson, et al., 2020). Algemeen wordt een lagere diversiteit van bodemmicro-organismen in verband gebracht met een lagere functionaliteit, zoals bijvoorbeeld minder snelle afbraak van substraten, verlaagde robuustheid tegenover veranderingen in abiotische omstandigheden en een lagere weerbaarheid tegen ziekteverwekkers (Singh and Gupta, 2018, van Elsas, et al., 2002). In tegenstelling tot deze verwachting was de weerbaarheid tegen *Pythium ultimum* juist hoog in de combi behandeling met een lage diversiteit. Dit zou het gevolg kunnen zijn van een verandering in de samenstelling van de gemeenschap.

Verder waren de ontsmettingsbehandelingen en vooral de combi behandeling het meest verschillend in de samenstelling van de microbiële gemeenschap van de controle en de overige behandelingen. Schimmel- gemeenschappen verschilden sterker na toepassing van ontsmettingsbehandelingen ONT-Cal, ASD en AHC dan bacteriën, wat erop wijst dat schimmels gevoeliger zijn voor degelijke behandelingen.

Echter waren ook bacteriële gemeenschappen beïnvloed door de combinatie behandeling. Tegenover de controle-behandeling was de abundantie van enkele genera van de Actinobacteria. Deze groep is bekend om hun rol in bodemweerbaarheid (Trivedi et al., 2017). Maar alhoewel de gemeenschappen sterke overlap toonden met onder ander anaerobe ontsmetting, verhoogde alleen de combi behandeling de weerbaarheid. Bacteriële genera die verschilden tussen de combi behandeling en zowel de controle als de anaerobe ontsmetting waren onder ander *Pseudomonas* sp., *Rhodanobacter* sp., *Pedobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Brevundimonas* sp. and *Acinetobacter* sp.. Soorten binnen het geslacht *Pseudomonas* zijn effectief in de ziektevering tegen verschillende pathogenen (Haas, et al., 1991). *Chryseobacterium* soorten zijn bekend om hun ziekteverende werking tegen *Phytophthora* (Kim et al., 2012). Er is minder informatie beschikbaar over de eigenschappen van *Rhodanobacter*, *Pedobacter*, *Brevundimonas* en *Acinetobacter*, maar ook hier duidt literatuur op een mogelijke ziekteverende eigenschappen (Yin et al., 2021). Onder de schimmelgenera tonen vooral *Mortierella*, *Mucor* en *Fusarium* een verhoogde abundantie in de combi behandeling vergeleken met de controle en de anaerobe ontsmetting. *Mortierella* soorten worden vaak gevonden in bodem die weerbaarheid toont tegen verschillende ziekteverwekkers en gelden als plantengroei bevorderende schimmels (Li, et al., 2018, Ozimek and Hanaka, 2021). Zowel *Mucor* als *Fusarium* bevatten soorten die vooral bekend zijn als ziekteverwekker. Niettemin zijn voor beide genera voorbeelden gevonden van saprofytische soorten en soorten die een correlatie hebben met weerbaarheid (Bonanomi et al., 2018). Mogelijk kan de verhoogde aanwezigheid van deze genera de verhoogde weerbaarheid tegen *P. ultimum* verklaren.

4.2 Biotoetsen (November 2018 en 2019)

Voor *R. solani* konden er geen verschillen in ziektevering worden gevonden tussen de behandelingen. Het is bekend dat ziektevering tegen *Rhizoctonia* berust op de activiteit van specifieke antagonistische micro-organismen (Wiseman, et al., 1996). De resultaten van deze studie geven aan dat deze antagonisten niet werden gestimuleerd door de gekozen behandelingen. Wel was de natuurlijke infectie opvallend laag in met chitine behandelde grond, wat erop duidt dat chitine de ziektedruk in het veld zou hebben gereduceerd. Eerder onderzoek toonde aan dat deze reductie voor een groot deel voortkomt uit de stimulatie van chitinase producerende micro-organismen en dat deze hun activiteit ook in een biotoets tot expressie kunnen laten komen (Andreo-Jimenez et al., 2021). Het is niet duidelijk, waarom dit niet het geval was in deze proef waarbij de behandelingen in het veld plaatsvonden. Mogelijk dat in deze proeven de ziektedruk door de toevoeging van *Rhizoctonia* inoculum te hoog was.

In tegenstelling tot *Rhizoctonia* kon er wel een effect op ziektevering tegen *P. ultimum* worden vastgesteld. Vooral de combibehandeling leidde tot reductie van de ziekte-incidentie. Dit was goed gecorreleerd met de verhoogde microbiële activiteit en biomassa in deze behandeling. De ziektevering tegen *P. ultimum* berust op generalistische ziektevering als gevolg van concurrentie met een grote hoeveelheid andere bacteriën en schimmels (McKellar and Nelson, 2003, Van Os and Van Ginkel, 2001). In een eerdere studie werd al gevonden dat anaerobe ontsmetting leidt tot een verandering in de bacteriële gemeenschap en de productie van vluchtige stoffen met een negatief effect op *Pythium intermedium* (van Agtmaal et al., 2015).

4.3 PLFAs (Maart 2020)

De totale microbiële biomassa en de biomassa van de aparte groepen schimmel- en bacteriën waren hoger in het biologische landbouwsysteem en in de compost en combi behandeling. Dit is te verwachten, omdat de toevoeging van organische stof over het algemeen de microbiële activiteit stimuleert door de aanwezigheid van voedingsstoffen (Schnürer, et al., 1985). Bacteriën zijn meestal verantwoordelijk voor de afbraak van makkelijk afbreekbare stoffen en schimmels voor complexere stoffen (Rousk and Frey, 2015). De compost behandeling bevorderde vooral schimmels door de hoge beschikbaarheid van recalcitrant organisch materiaal. De combi behandeling bevorderde vooral bacteriën, wat gerelateerd kan zijn aan de toepassing van anaerobe grondontsmetting die vooral zorgt voor makkelijk afbreekbare nutriënten uit dode micro-organismen en nutriënten uit toevoeging van organisch materiaal. Dit werd ook bevestigd door de verlaagde verhouding tussen grampositieve en gramnegatieve bacteriën, omdat gramnegatieve bacteriën meestal worden geassocieerd met snelle groei.

In zowel het biologische landbouwsysteem als de combi en compost-behandeling was de hoeveelheid AMF verhoogd, alhoewel de schimmeldiversiteit in het algemeen gereduceerd was in de combi behandeling. Over het effect van anaerobe ontsmetting of haarmeel op AMF is weinig bekend, in tegenstelling tot compost, waarbij meestal een stimulerende werking op AMF kolonisatie is gevonden (Cavagnaro, 2015). Het is dus aannemelijk dat de toevoeging van compost een bijdrage heeft geleverd aan de AMF kolonisatie.

Ook de hoeveelheid Actinobacteria was verhoogd in het biologische landbouwsysteem en de compost en combi behandeling. De sequentie-data lieten zien dat vooral de genera *Streptomyces*, *Gaiella*, *Thermoactinomyces* en *Nocardioidea* verhoogd waren in een of beide behandelingen tegenover de controle. De aanwezigheid van Actinobacteria wordt vaak in verband gebracht met een hogere ziektevering (Mendes, et al., 2011). Dit correleert met de combi behandeling waarbij een hogere ziektevering tegen *P. ultimum* werd gevonden.

Een hogere concentratie PLFAs van *Desulfovibrio* in de combi behandeling was verwacht, omdat anaerobe ontsmetting erom bekend staat dat het de aantallen sulfaat-reducerende bacteriën verhoogt

(Streminska et al., 2013). Compost toevoeging werd ook in verband gebracht met verhoogde aantallen van deze groep (Santini et al., 2010).

4.4 Microbiële biomassa (Maart 2020)

De metingen van de microbiële biomassa (i.e. schimmel biomassa en bacteriële biomassa) met klassieke microscopische methoden kwam niet overeen met de resultaten van de PLFA analyse of de DNA metingen middels qPCR. Een vergelijking met de qPCR analyse is lastiger, omdat deze een jaar voor de PLFA en klassieke meting is gedaan. Oorzaak van het verschil tussen PLFA meting en klassieke methode zou kunnen zijn dat het met klassieke methoden niet altijd mogelijk is om levende van niet levende organismen te onderscheiden. Omdat PLFAs snel worden afgebroken in de bodem, kan worden gesteld dat deze wel afkomstig zijn van levende bacteriën en schimmels. Ook wordt voor schimmels alleen de lengte van de schimmeldraden bepaald voor de berekening van de biomassa en niet het volume, wat kan bijdragen aan het verschil tussen deze twee methodes.

4.5 HWC en PMN (Maart 2019 en 2020)

In de twee jaren na de behandeling, 2019 en 2020, was HWC verhoogd in de compost en combi behandeling en PMN liet hetzelfde patroon zien in 2020. Dit duidt op een lange termijn effect van de behandeling. De verhoging is waarschijnlijk het gevolg van inbreng van organische stof en in het geval van anaerobe ontsmetting in combinatie met een reductie van bodem micro-organismen waarna er vervolgens een verhoogde activiteit ontstaat van snelgroeiende organismen. In de combinatie behandeling worden deze effecten gecombineerd, wat resulteert in de hoogste HWC en PMN concentraties van alle behandelingen. Ook in de ONT-cal behandeling wordt organisch materiaal toegevoegd in de vorm van zaadmeel wat verantwoordelijk kan zijn voor het verschil in HWC tussen de ONT-ngo en ONT-cal behandeling. Zowel HWC als PMN waardes zijn een indicator voor respectievelijk C en N in de microbiële biomassa die makkelijk afbreekbaar en vervolgens beschikbaar zijn voor de opname door planten. Ook geldt HWC als een gevoelige indicator voor het toenemen van organische stof in de bodem.

Het is opvallend dat HWC en PMN geen correlatie vertonen met de microbiële biomassa zoals gemeten met de klassieke microscopie methode, maar wel met de PLFA meting. Mogelijk komt dit omdat beide methoden ook niet-levend materiaal meten.

4.6 Bodemrespiratie en Microresp (Maart 2020)

De bodemrespiratie was in 2020 verhoogd in de combi behandeling, wat past bij de overige resultaten, die een verhoogde microbiële biomassa en activiteit in deze behandeling laten zien. De basale respiratie (na toevoeging van water) en de multiple substraat geïnduceerde respiratie (MSIR) verschilden echter niet tussen de behandelingen. Het lijkt er dus op dat de gereduceerde diversiteit en veranderde microbiële samenstelling geen negatief effect had op de afbraak van organische stoffen in de grond op lange termijn.

Lignine werd vooral gebruikt in de combi en compost behandeling, wat duidt op de aanwezigheid en activiteit van micro-organismen die complexe substraten kunnen afbreken. De toevoeging van organische stof kan deze micro-organismen bevorderen. Dit sluit aan bij het resultaat dat een hogere schimmelbiomassa (gemeten met PLFA en qPCR) werd gevonden in de combi en compost behandeling. Schimmels staan bekend om hun vermogen om complexere substraten, en vooral lignine, af te breken (Strickland and Rousk, 2010), alhoewel ook sommige bacteriesoorten hiertoe in staat zijn. Het hogere gebruik van lignine correleert met een hogere abundantie van het genus *Mortierella* in de combi en compost behandeling. Soorten in dit genus staan erom bekend dat ze complexere stoffen, zoals cellulose en chitine, goed kunnen afbreken (Ozimek and Hanaka, 2021).

4.7 Algemene discussie

Er zijn opvallend weinig verschillen gevonden in microbiële biomassa tussen het gangbare en biologische systeem, terwijl vaak wordt verwacht dat het gebruik van meer organische mest de microbiële biomassa en activiteit verhoogt. Ook andere parameters, zoals HWC, PMN en weerbaarheid verschilden niet tussen de landbouwsystemen. Daarnaast worden zoveel mogelijk getracht om behandelingen in beide systemen vergelijkbaar uit te voeren, zoals verschillende grondbewerkingen. Ook dit heeft ongetwijfeld grote gevolgen op de bodembioologie die mogelijk kleinere verschillen tussen het gangbare en het biologische systeem hebben gemaskeerd.

Vooraf de combibehandeling had een sterk effect op de samenstelling van de microbiële gemeenschap. Net als bij de andere ontsmettingsbehandelingen was de diversiteit van zowel schimmels als bacteriën verlaagd. Dit kan direct en indirect een gevolg zijn van de ontsmetting maar ook van de grote hoeveelheid organische materiaal die is aangevoerd. De anaerobe omstandigheden kunnen dodelijk zijn voor een aantal soorten, maar ook goed groeiende soorten kunnen stoffen producerende die andere bacteriën en schimmels afdoden. Vaak leidt een reductie van diversiteit tot een afname van bodemfuncties. Niettemin werd voor de combibehandeling nog in hetzelfde jaar en het daaropvolgende jaar een verhoogde weerbaarheid tegen *P. ultimum* gevonden. Dit was echter niet het geval voor de andere ontsmettingsbehandelingen. Het is mogelijk dat de sterke groei van micro-organismen na afloop van de ontsmettingsbehandeling werd bevorderd door de toevoeging van haarmeel en compost en op deze manier een sterke generalistische weerbaarheid werd opgebouwd. Verder verschilde de samenstelling van het microbioom tussen de behandeling en waren enkele genera verhoogd in de combi-behandeling, zowel in vergelijking met de controle en de anaerobe ontsmettingsbehandeling. Dit kan aanduiden dat bepaalde microbiële groepen die verantwoordelijk zijn voor een hogere weerbaarheid in aantal toenemen in deze behandeling.

Ook andere parameters, die indicator kunnen zijn voor verschillende bodemfuncties, verschilden in de combi behandeling en duiden meestal op een potentiële verbetering van deze functies. Deze zijn echter een of twee jaar na de behandeling en de bepaling van het microbioom gemeten. Daarom is het mogelijk dat diversiteit en samenstelling van de microbiële gemeenschap in de tijd zijn veranderd. Het kan dus niet worden gesteld dat de combi behandeling ondanks een verlaagde diversiteit of vanwege een veranderd microbioom een positief effect had op bijvoorbeeld microbiële biomassa en HWC. Wat wel kan worden geconcludeerd is dat de lange termijn effecten over meerdere jaren na deze behandeling aanwezig bleven.

Toevoeging van compost had eveneens, in mindere mate, een gunstig effect op meerdere bodemparameters. Echter verschilde deze behandeling amper van de controle wat microbiële diversiteit en samenstelling betreft. Ook hier kan geen direct verband worden gelegd tussen het microbioom en de overige metingen. Het monitoren van het microbioom over meerdere jaren sinds de behandeling zou uitsluitsel kunnen geven over de lange termijn gevolgen van de behandelingen en het verband met andere bodemparameters en functionele aspecten van de bodem.

4.8 Conclusie

De combinatie behandeling van anaerobe ontsmetting, haarmeel en compost had een groot effect op het bodemmicrobiom. Verder waren er gunstige veranderingen in meerdere andere bodemindicatoren die ook twee jaar later nog meetbaar waren. Soms correleerde de veranderingen ook met het beter functioneren van de bodem, zoals een verhoogde weerbaarheid tegen pathogenen en decompositie van moeilijk afbreekbare verbindingen. Toevoeging van compost heeft eveneens een gunstig effect. Over het mechanisme achter deze veranderingen is echter nog weinig bekend.

Literatuur

- B. Andreo-Jimenez, et al. (2021). Chitin- and keratin-rich soil amendments suppress *Rhizoctonia solani* disease via changes to the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(11), e00318-21. doi:doi:10.1128/AEM.00318-21.
- G. Bonanomi, F. De Filippis, G. Cesarano, A. La Stora, D. Ercolini and F. Scala (2016). Organic farming induces changes in soil microbiota that affect agro-ecosystem functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 327-336. doi:https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.005.
- G. Bongiorno, et al. (2019). Soil suppressiveness to *Pythium ultimum* in ten European long-term field experiments and its relation with soil parameters. *Soil Biology and Biochemistry*, 133, 174-187.
- T. R. Cavagnaro (2015). Chapter Five - Biologically Regulated Nutrient Supply Systems: Compost and Arbuscular Mycorrhizas—A Review. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (pp. 293-321). Academic Press. doi:https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.09.005.
- R. C. Dalal (1998). Soil microbial biomass-what do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38(7), 649-665. doi:https://doi.org/10.1071/EA97142.
- D. Finney, J. Buyer and J. Kaye (2017). Living cover crops have immediate impacts on soil microbial community structure and function. *Journal of Soil and Water Conservation*, 72(4), 361-373.
- D. Haas, et al. (1991). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. In (Ed.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1* (pp. 450-456). Springer.
- M. Hartmann, B. Frey, J. Mayer, P. Mäder and F. Widmer (2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal*, 9(5), 1177-1194. doi:10.1038/ismej.2014.210.
- F. Li, et al. (2018). *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. *Land Degradation & Development*, 29(6), 1642-1651. doi:https://doi.org/10.1002/ldr.2965.
- M. Lupatini, G. W. Korthals, M. de Hollander, T. K. Janssens and E. E. Kuramae (2017). Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2064.
- M. Mazzola (2002). Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases (journal article). *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 557-564. doi:10.1023/a:1020557523557.
- M. Mazzola, J. Muramoto and C. Shennan (2018). Anaerobic disinfestation induced changes to the soil microbiome, disease incidence and strawberry fruit yields in California field trials. *Applied Soil Ecology*, 127, 74-86. doi:https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.03.009.
- M. E. McKellar and E. B. Nelson (2003). Compost-Induced Suppression of *Pythium* Damping-Off Is Mediated by Fatty-Acid-Metabolizing Seed-Colonizing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 452-460. doi:doi:10.1128/AEM.69.1.452-460.2003.
- R. Mendes, et al. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100. doi:10.1126/science.1203980.
- E. Ozimek and A. Hanaka (2021). *Mortierella* Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils. *Agriculture*, 11(1), 7. https://www.mdpi.com/2077-0472/11/1/7.
- A. T. Poret-Peterson, N. Sayed, N. Glyzowski, H. Forbes, E. T. González-Orta and D. A. Kluepfel (2020). Temporal Responses of Microbial Communities to Anaerobic Soil Disinfestation. *Microbial Ecology*, 80(1), 191-201. doi:10.1007/s00248-019-01477-6.
- J. Rousk and S. D. Frey (2015). Revisiting the hypothesis that fungal-to-bacterial dominance characterizes turnover of soil organic matter and nutrients. *Ecological Monographs*, 85(3), 457-472.
- J. Schnürer, M. Clarholm and T. Rosswall (1985). Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(5), 611-618. doi:https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90036-7.
- J. S. Singh and V. K. Gupta (2018). Soil microbial biomass: a key soil driver in management of ecosystem functioning. *Science of the Total Environment*, 634, 497-500.
- E. A. Stockdale and P. C. Brookes (2006). Detection and quantification of the soil microbial biomass – impacts on the management of agricultural soils. *The Journal of Agricultural Science*, 144(4), 285-302. doi:10.1017/S0021859606006228.
- J. D. van Elsas, P. Garbeva and J. Salles (2002). Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, 13(1), 29-40. doi:10.1023/A:1016393915414.
- G. Van Os and J. Van Ginkel (2001). Suppression of *Pythium* root rot in bulbous Iris in relation to biomass and activity of the soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(11), 1447-1454.

B. M. Wiseman, S. M. Neate, K. O. Keller and S. E. Smith (1996). Suppression of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 8 in Australia and its biological nature. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(6), 727-732. doi:[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00178-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00178-6).

Bijlage 1 Bodemvruchtbaarheid

1.2 Metingen

Bodemvruchtbaarheid is gemeten in Maart 2020.

Plantbeschikbaar P is geëxtraheerd met 0.01 M CaCl₂. S, K, Mg en Na zijn geëxtraheerd met 0.01 M CaCl₂ met ICP-AES. P-Al is geëxtraheerd met een mengsel van 0.1 M ammonium lactaat en 0.4 M azijnzuur (pH 3.75).

Totaal N is gemeten met Duma's combustion met een elemental analyzer. Totaal S is gemeten met inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). Effectief CEC, K-CEC, Mg-CEC en Ca-CEC zijn gemeten met cobalt-hexamine trichloride extractie gevolgd door ICP-AES en AAS. Organische stof is gemeten door loss on ignition (550°C). Organische C is gemeten via bepaling van elementale C (550°C). Anorganische C is gemeten door verzuring en verwijderen van het afgegeven CO₂. Klei inhoud is gemeten bij dichtheids-fractionering. Sand inhoud is gemeten na verwijderen van zouten en organische stof en zeven.

2.2 Resultaten

Tabel 1: Samenvatting van bodemchemische parameters met een significant verschil tussen biologische en gangbare landbouw.

Variable	Landbouw	mean	sd	se	ci
C:N ratio	Biologisch	17.58	1.31	0.38	0.83
C:N ratio	Gangbaar	18.83	1.70	0.49	1.08
K bodemvoorraad (mmol+/kg)	Biologisch	2.11	0.34	0.10	0.22
K bodemvoorraad (mmol+/kg)	Gangbaar	1.78	0.23	0.07	0.15
H bezetting (%)	Biologisch	0.10	0.00	0.00	0.00
H bezetting (%)	Gangbaar	0.13	0.05	0.01	0.03
K bezetting CEC (%)	Biologisch	3.60	0.66	0.19	0.42
K bezetting CEC (%)	Gangbaar	3.08	0.55	0.16	0.35
N leverbaar (kg N/ha)	Biologisch	43.75	6.08	1.75	3.86
N leverbaar (kg N/ha)	Gangbaar	37.50	8.12	2.34	5.16
P plantbeschikbaar (mg P/kg)	Biologisch	3.93	1.04	0.30	0.66
P plantbeschikbaar (mg P/kg)	Gangbaar	2.85	1.15	0.33	0.73
Pw (mg P ₂ O ₅ /l)	Biologisch	66.42	9.33	2.69	5.93
Pw (mg P ₂ O ₅ /l)	Gangbaar	52.75	13.75	3.97	8.73
P-Al (mg P ₂ O ₅ / 100g)	Biologisch	72.00	9.10	2.63	5.78
P-Al (mg P ₂ O ₅ / 100g)	Gangbaar	59.92	12.51	3.61	7.95
Anorganisch C (%)	Biologisch	0.04	0.00	0.00	0.00
Anorganisch C (%)	Gangbaar	0.04	0.01	0.00	0.01
K plantbeschikbaar (mg K/kg)	Biologisch	108.17	24.40	7.04	15.50
K plantbeschikbaar (mg K/kg)	Gangbaar	69.08	17.78	5.13	11.30
S leverbaar (kg S/ha)	Biologisch	7.33	2.19	0.63	1.39
S leverbaar (kg S/ha)	Gangbaar	5.67	2.15	0.62	1.36
C:S ratio	Biologisch	94.92	12.43	3.59	7.90

C:S ratio	Gangbaar	104.67	13.01	3.75	8.26
-----------	----------	--------	-------	------	------

Tabel 2: Samenvatting van bodemchemische parameters met een significant verschil tussen de drie verschillende behandelingen.

Variable	Code	mean	sd	se	ci	Group
B plantbeschikbaar (µg B/kg)	AHC	143.13	26.76	9.46	22.37	B
B plantbeschikbaar (µg B/kg)	CMP	147.13	25.59	9.05	21.39	B
B plantbeschikbaar (µg B/kg)	CTR	133.50	30.09	10.64	25.16	A
Ca bezetting CEC (%)	AHC	69.75	5.90	2.09	4.93	A
Ca bezetting CEC (%)	CMP	76.50	3.59	1.27	3.00	B
Ca bezetting CEC (%)	CTR	77.25	5.85	2.07	4.89	B
Ca bodemvoorraad (kg Ca/ha)	AHC	2805.63	631.46	223.25	527.91	A
Ca bodemvoorraad (kg Ca/ha)	CMP	3210.63	570.34	201.65	476.82	B
Ca bodemvoorraad (kg Ca/ha)	CTR	2929.38	717.22	253.58	599.61	A
Anorganisch C (%)	AHC	0.04	0.01	0.00	0.00	A
Anorganisch C (%)	CMP	0.04	0.00	0.00	0.00	B
Anorganisch C (%)	CTR	0.05	0.01	0.00	0.01	B
Ca voorraad (mmol+/kg)	AHC	43.63	10.10	3.57	8.44	A
Ca voorraad (mmol+/kg)	CMP	48.25	9.39	3.32	7.85	B
Ca voorraad (mmol+/kg)	CTR	44.38	11.44	4.04	9.56	A
Co plantbeschikbaar (µg Co/kg)	AHC	8.29	2.23	0.79	1.86	B
Co plantbeschikbaar (µg Co/kg)	CMP	4.39	1.39	0.49	1.16	A
Co plantbeschikbaar (µg Co/kg)	CTR	4.74	1.87	0.66	1.57	A
Organisch C (%)	AHC	2.21	0.39	0.14	0.33	B
Organisch C (%)	CMP	2.13	0.37	0.13	0.31	B
Organisch C (%)	CTR	1.95	0.24	0.09	0.20	A

Cu plantbeschikbaar (µg Cu/kg)	AHC	48.75	11.68	4.13	9.77	B
Cu plantbeschikbaar (µg Cu/kg)	CMP	40.25	9.41	3.33	7.86	A
Cu plantbeschikbaar (µg Cu/kg)	CTR	37.13	11.04	3.90	9.23	A
K plantbeschikbaar (mg K/kg)	AHC	90.75	28.17	9.96	23.55	B
K plantbeschikbaar (mg K/kg)	CMP	95.00	32.05	11.33	26.80	B
K plantbeschikbaar (mg K/kg)	CTR	80.13	28.04	9.91	23.44	A
Mg plantbeschikbaar (mg Mg/kg)	AHC	105.13	29.60	10.46	24.75	A
Mg plantbeschikbaar (mg Mg/kg)	CMP	140.38	25.86	9.14	21.62	B
Mg plantbeschikbaar (mg Mg/kg)	CTR	145.25	52.03	18.40	43.50	B
Mn plantbeschikbaar (µg Mn/kg)	AHC	2461.25	386.39	136.61	323.03	B
Mn plantbeschikbaar (µg Mn/kg)	CMP	1026.25	256.23	90.59	214.22	A
Mn plantbeschikbaar (µg Mn/kg)	CTR	1005.00	454.00	160.51	379.55	A
N leverbaar (kg N/ha)	AHC	46.88	4.58	1.62	3.83	B
N leverbaar (kg N/ha)	CMP	36.88	7.99	2.82	6.68	A
N leverbaar (kg N/ha)	CTR	38.13	6.51	2.30	5.44	A
Oganische stof (%)	AHC	3.95	0.67	0.24	0.56	C
Oganische stof (%)	CMP	3.75	0.62	0.22	0.52	B
Oganische stof (%)	CTR	3.46	0.53	0.19	0.44	A
pH	AHC	5.36	0.12	0.04	0.10	A
pH	CMP	5.65	0.18	0.06	0.15	B
pH	CTR	5.55	0.24	0.09	0.20	B
P plantbeschikbaar (mg P/kg)	AHC	4.28	1.21	0.43	1.01	B

P plantbeschikbaar (mg P/kg)	CMP	3.08	0.83	0.30	0.70	A
P plantbeschikbaar (mg P/kg)	CTR	2.83	1.11	0.39	0.93	A
S leverbaar (kg S/ha)	AHC	7.88	2.64	0.93	2.21	B
S leverbaar (kg S/ha)	CMP	6.00	2.00	0.71	1.67	A
S leverbaar (kg S/ha)	CTR	5.63	1.69	0.60	1.41	A
S totaal (mg S/kg)	AHC	235.00	32.51	11.50	27.18	C
S totaal (mg S/kg)	CMP	207.50	28.66	10.13	23.96	B
S totaal (mg S/kg)	CTR	188.75	25.32	8.95	21.17	A
Verslemping	AHC	7.79	0.14	0.05	0.11	B
Verslemping	CMP	7.78	0.12	0.04	0.10	B
Verslemping	CTR	7.70	0.11	0.04	0.09	A
Zn plantbeschikbaar (µg Zn/kg)	AHC	1680.00	368.63	130.33	308.18	B
Zn plantbeschikbaar (µg Zn/kg)	CMP	1127.50	288.43	101.98	241.14	A
Zn plantbeschikbaar (µg Zn/kg)	CTR	1107.50	283.94	100.39	237.38	A

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research

Open Teelten

Edelhertweg 1

Postbus 430

8200 AK Lelystad

T (+31)320 29 11 11

www.wur.nl/openteelten

Rapport WPR-OT 925

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6,000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.
