



Wortelmilieu: rol van substraat, additieven en micro-organismen in een weerbaar substraat

Eindrapport TKI/Cv100/KIJK-project wortelmilieu

Pieter de Visser, Marta Streminska, Chris Blok, Gerdit Greve, Nina Oud, Barbara Eveleens-Clark, Hwei Ming Huisman

Rapport WPR-1263

Referaat

Het door Topsector T&U, Stichting KIJK en Cv100 gefinancierde project wortelmilieu heeft gedurende de periode 2019-2022 onderzoek gedaan naar de rol van de microbiologie -via functionele groepen- in de weerbaarheid en nutriëntendynamiek van glastuinbouwsubstraten. In dit rapport worden de resultaten van de biotoets in 2021 en van de validatieproef in de praktijk gepresenteerd en gerelateerd aan eerdere proefbevindingen. Een komkommerngewas werd getoetst op het effect van additieven op de weerbaarheid tegen *Pythium* en *Fusarium*. Ziekte en uitval van komkommerplanten door *Fusarium* werd vertraagd door toevoegingen van champost of champostthee. Daarbij verhoogde de activiteit van het schimmelafbrekende chitinase, aangetoond via zowel enzymbepaling als genexpressie. Ziektesymptomen door *Pythium* waren in de biotoets, net als in de biotoets in 2020 op steenwolmatten, alleen aan de wortels zichtbaar, zonder verband te houden met type en niveau van toeslagstof. Uit de metabarcoding analyse, uitgevoerd aan monsters van alle drie in het project uitgevoerde proeven (jaren 2019-2021), bleek dat de microbiële samenstelling significant verschilde tussen de substraattypen en door toevoeging van de toeslagstoffen biochar, champost en chitine, alsmede door de aan- of afwezigheid van planten in het substraat. Met de gemeten substraatcondities en organische stof dynamiek zijn rekenregels opgesteld in een rekentool waarmee de stikstof- en organische stof-dynamiek wordt voorspeld. De gebouwde rekentool biedt telers en substraatleveranciers inzicht in stikstofbeschikbaarheid maar is nog niet praktijkrijp. Rekenen aan de rol van het microbiom was te ambitieus, maar er is nu meer inzicht in het weerbaarder maken van het wortelmilieu.

Abstract

In the years 2019-2022 the findings of the project 'Root environment', financed by TKI, KIJK and Cv100, have generated much insight in the role of microbial functions in the disease resistance and nutrient dynamics of greenhouse slabs. In this report the results of greenhouse experiment in 2021 and the validation experiment in practice in 2023 are presented. A cucumber crop was tested on the effect of additives on resistance to *Pythium* and *Fusarium*. Champost and champost tea were shown to slow down *Fusarium* infection as well as the disease symptoms and loss of cucumber plants. In addition, higher activity of the fungal-degrading chitinase was demonstrated through both enzyme determination and gene expression. *Pythium* symptoms were only visible at the roots, as in the trial in 2020 on rockwool slabs, without being related to the type and level of additive. A metabarcoding analysis was performed on samples from all three trials carried out in the project (years 2019-2021) and showed that the microbial composition differed significantly between the substrate types, by addition of the additives biochar, champost and chitin, and by presence or absence of plants in the substrate. With the measured substrate conditions and organic matter dynamics, calculation rules have been drawn up in a calculation tool to predict nitrogen and organic matter dynamics. The calculation tool offers growers and substrate suppliers insight into the nitrogen availability from fertilizers and substrate, but is not yet ready for practical use. Calculation rules on disease suppression were not formulated due to the complex processes involved, but some general recommendations could be given.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1263

Projectnummer: 3742267300

BO-nummer: BO-556-001-033

DOI: <https://doi.org/10.18174/644104>

Disclaimer

© 2023 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, 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 aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

F +31 (0)10 - 522 51 93

glastuinbouw@wur.nl

wur.nl/glastuinbouw

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
1.1 Achtergrond	7
1.2 Voorgaande bevindingen	8
1.3 Doelstellingen van het experiment in 2021	9
1.4 Organisatie	9
2 Aanpak kasproeven en rekentool	10
2.1 Kasproef: overzicht behandelingen	10
2.1.1 Behandelingen en plattegronden	10
2.1.2 Substraat en fertigatie	11
2.2 De factor toeslagstof	12
2.2.1 Champostthee	12
2.2.2 Vaste champost en chitine	12
2.3 De factor ziekte: <i>Pythium</i> of <i>Fusarium</i>	13
2.4 Metingen aan substraat en gewas	13
2.4.1 Bemonstering substraat voor microbiologische analyse	13
2.4.2 Substraat voeding	14
2.4.3 Gewas	14
2.5 Metingen van microbiële activiteit en van DNA van functionele groepen	14
2.5.1 OUR-metingen	14
2.5.2 Chitinase-activiteit	15
2.5.3 DNA-extractie	15
2.5.4 qPCR analyses	15
2.6 Metingen ziekteontwikkeling in 2021	16
2.7 Metabarcoding van het microbioom in de groeimedia	17
2.8 Opzet rekentool	17
2.8.1 Substraatprocessen: van functionele groepen naar rekenregels	17
2.8.2 De Rekentool	20
3 Resultaten kasproef 2021	21
3.1 Resultaat metingen substraat en gewas	21
3.1.1 Substraat	21
3.1.2 Gewas	22
3.2 De microbiële activiteit	24
3.2.1 Oxygen Uptake Rate (OUR) metingen	24
3.2.2 Chitinase activiteit	24
3.3 qPCR analyses	26
3.3.1 Aantallen van bacteriën (16S rDNA gen)	26
3.3.2 Aantallen van ammoniak-oxiderende bacteriën (eng. AOB)	27
3.3.3 Aantallen van bacteriën met <i>aiiA</i> lactonase	27
3.3.4 Aantallen van bacteriën met chitinase (<i>chiA</i>) gen	29
3.4 Samenstelling van bacteriële microbioom in groeimedia (metabarcoding analyse)	31
3.4.1 Bacteriële en schimmel microbioom van veen potgrond tijdens de teelt van pottomaat met organische meststoffen	31
3.4.2 Microbioom van steenwol en kokos groeimedia tijdens teelt van de komkommer (proef 2020)	33
3.4.3 Microbioom van steenwol groeimedia tijdens teelt van de komkommer (proef 2021)	36

3.5	Ziekteontwikkeling	38
3.5.1	Kasproef	38
3.5.2	Ziekteontwikkeling door <i>Pythium</i>	38
3.5.3	Ziekteontwikkeling door <i>Fusarium</i>	40
3.6	Toepassing Rekentool op proef in 2021	43
4	Validatie rekentool	46
4.1	Opzet	46
4.2	Resultaten	48
4.3	Inzetbaarheid in de teeltpraktijk	52
4.4	Conclusies	53
5	Discussie en conclusies	55
5.1	Opgedane kennis over meetmethoden wortelmilieu	55
5.2	Discussie over de sleutelprocessen	56
	Literatuur	59

Samenvatting

Het door Topsector T&U, Stichting KIJK en Cv100 gefinancierde project Wortelmilieu is uitgevoerd in de jaren 2019-2022. Hierbij zijn literatuurstudie, kasproeven en modellering uitgevoerd om een beter inzicht te krijgen in de rol en mogelijke sturing van functionele microbiologische groepen in de weerbaarheid van het glastuinbouw substraat tegen bodempathogenen die schadelijk zijn voor het gewas.

In dit rapport worden de resultaten van de biotoets in 2021 en van de validatieproef in de praktijk gepresenteerd en gerelateerd aan eerdere proefbevindingen. De biotoets bestond uit een kasproef met een komkommernewas waarbij het effect van additieven op verhoging van de weerbaarheid tegen *Pythium* en *Fusarium* werd getoetst. De additieven betroffen champost, champostthee en chitine (niet het veel gebruikte chitosan), allen getoetst bij twee toedieningsniveaus. Er werd vloeibare organische voeding gegeven. In de proefopzet zijn wat keuzen gemaakt naar aanleiding van ervaringen in voorgaande jaren: (1) alleen steenwol als substraat omdat dit goed stuurbaar is qua voeding, en de werking van de additieven mogelijk meer in het oog springt dan bij een complex substraat als veen of compost, (2) vloeibare minerale voeding met nitraat van organische oorsprong (organische stof is gemineraliseerd tijdens de bereiding van de voeding), ter vermijding van stikstoflimitatie door te trage start van de mineralisatie van de organische stikstof, (3) tevens organische voeding (Viscotec) met daarbij nauwkeurig handhaven van de pH want deze wordt sterk beïnvloed door de stikstofomzettingen, (4) vroege toevoeging van de pathogenen, (5) frequente sampling om snelle fluctuaties in concentratie te kunnen traceren.

De biotoets liet zien dat de ziekte en uitval van komkommerplanten door *Fusarium* vertraagde door toevoegingen van champost of champostthee. Daarbij werd hogere activiteit van het schimmelafbrekende chitinase aangetoond via zowel enzymbepaling als genexpressie. Dit was vooral 3 weken na planten zichtbaar, na 5 weken was dit effect al veel minder. Dit gold voor zowel exo- als endochitinase. Het gemiddelde beeld dat champost tegen pathogenen werkt, werd niet altijd bij de individuele behandelingen gevonden en was nogal wisselend. Zo kwamen in de behandeling met de lage champosttoediening de meeste gezonde wortels voor, maar kende deze behandeling wel veel externe schadesymptomen en dode planten. Naast effecten van champost vonden we ook na toediening van chitine een effect in het substraat: er werd een verhoging gemeten van expressie van het gen *chiA*, verantwoordelijk voor vorming van chitine-afbrekende enzymen. Deze enzymen kunnen pathogene schimmels bestrijden.

Ziektesymptomen door *Pythium* waren in de biotoets, net als in de biotoets in 2020 – op steenwolmatten – alleen aan de wortels zichtbaar, waarbij alleen bij toediening van de hoge dosering van champost geen ziektesymptomen waren waargenomen.

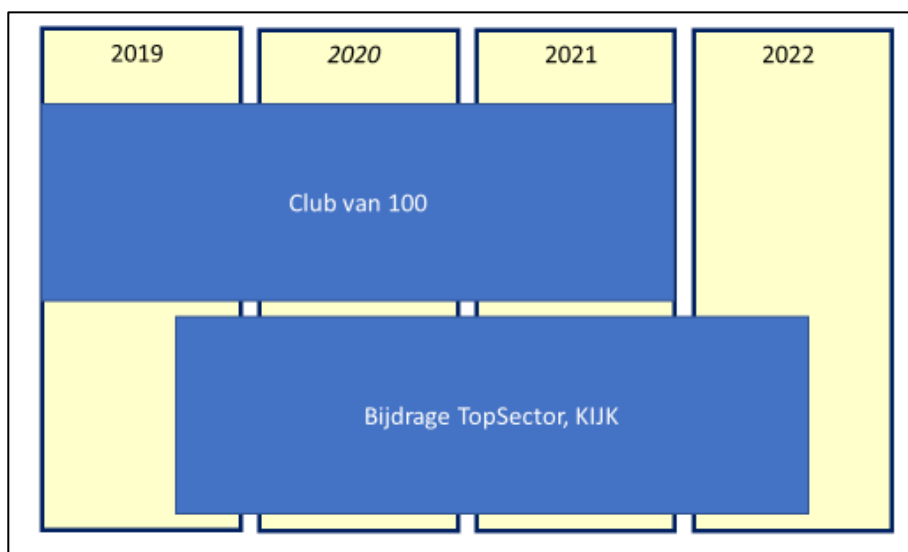
Tevens is de aanwezigheid van bacteriën en schimmels in het microbiom gekarakteriseerd middels een metabarcoding analyse op fyllum- en geslachtsniveau. De analyse betrof de monsters van alle drie in het project uitgevoerde proeven (jaren 2019-2021). Hieruit bleken er significante verschillen in (a) bacteriële samenstelling te zijn tussen de gebruikte substraten (i.e. veen, kokos en steenwol), (b) tussen de vloeibare en vaste meststof (proef 2019), (c) tussen toeslagstoffen in steenwol (biochar en champost in proef 2020, en champost en chitine in 2021) en (d) tussen wel of geen plant in de steenwol.

Met de gemeten substraatcondities en organische stof dynamiek zijn rekenregels opgesteld in een rekentool waarmee de stikstof- en organische stof-dynamiek worden voorspeld. Vanuit de vele modelconcepten is de keuze gemaakt om te rekenen met voorraden van organische koolstof en stikstof, die via een dagelijkse rekenstap met een bepaalde fractie worden omgezet in minerale vorm. Daarbij is die afbraakfractie afhankelijk van de abiotische wortelklimaatcondities temperatuur, watergehalte en pH. Voor de proef uit 2021 kon de rekentool adequaat worden geijkt zodat meting en voorspelling van opgeloste organische stof (TOC) en ammonium overeen kwamen. In principe kan de rekentool de interactie tussen substraattypen, organische toevoegingen en klimaatcondities op nutriëntenbeschikbaarheid voorspellen, mits gevoed met invoerdata en regelmatige metingen voor check van de modeluitkomst. Voor kwantitatieve rekenregels over het effect van toevoegingen op weerbaarheid in het wortelmilieu is de kennis nog te beperkt. Kwalitatieve adviezen zijn met de onderzoeksresultaten echter wel te geven. De bruikbaarheid voor telers en substraatleveranciers om de rekentool in te zetten worden geëvalueerd.

Bij de afsluitende projectevaluatie zijn relevante partijen uit de sector betrokken. De evaluatie geeft aan dat de huidige kennis bruikbaar is om de praktijk te ondersteunen om het wortelmilieu in glasteelten weerbaarder te maken met behulp van het sturen van de functionele groepen van het microbioom. Het gewenste, ideale niveau van de toeslagstof blijft moeilijk exact vast te stellen doordat elke teelt, elk klimaatjaar en substraat weer anders is. Daarom is het advies om altijd het substraat te blijven doormeten, zowel op gangbare variabelen (o.a. zuurgraad, zuurstof en stikstofvormen), als op complexere aspecten zoals microbiële samenstelling en genexpressie.

1 Inleiding

Dit verslag beschrijft het praktische onderzoek dat in 2021 is verricht voor het in 2019 op initiatief van de Club van 100 gestarte project Wortelmilieu. Tevens vat het rapport de bevindingen van de projectjaren 2019 en 2020 samen en wordt de rapportage afgerond met een evaluatie en een toekomstperspectief. De eerste uitkomsten (literatuuronderzoek en eerste twee teeltexperimenten) in 2019 lieten al zien dat de voorgestelde aanpak met additieven die de microbiologie stimuleren zinvol was. Daarom is een uitbreiding van het onderzoek voor 2020-2022 gevraagd en gehonoreerd door de Topsector en Stichting KIJK (Figuur 1.1). De uitbreiding bestond uit een verbreding van het onderzoek naar meerdere gangbare substraten, meerdere gangbare gewassen en meerdere gangbare ziekten. De verbreding is bedoeld om de kennis voor een grotere groep teelten en teeltsystemen relevant en toepasbaar te maken.

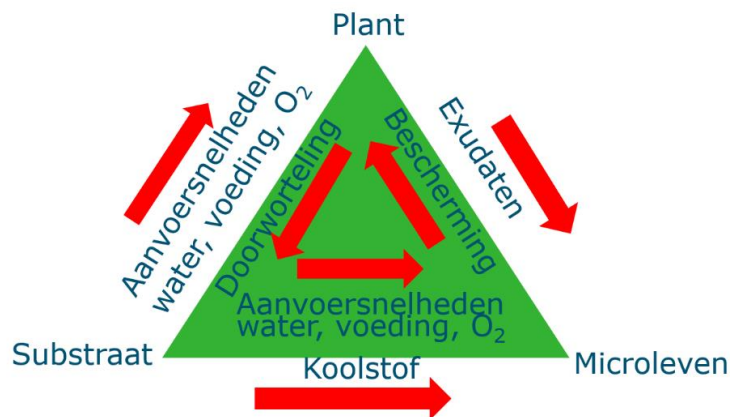


Figuur 1.1 Overzicht van looptijd en financiers van het project Wortelmilieu.

1.1 Achtergrond

De achtergrond van dit meerjarige project is de mogelijkheden te onderzoeken om via microbiële processen de weerbaarheid in het wortelmilieu te verhogen alsmede de beschikbaarheid van nutriënten voor plantengroei te bevorderen. In de (glas)tuinbouw vraagt de maatschappij ten aanzien van bodemziekten om een verminderd middelengebruik, en ten aanzien van bemesting om de inzet van hernieuwbare meststoffen. Verhoogde weerbaarheid van het wortelmilieu tegen ziekten en plagen zal de noodzaak tot het gebruik van chemische gewasbescherming sterk verlagen. In dit project wordt weerbaarheid gedefinieerd als de onderdrukking van ontwikkeling van ziektesymptomen in het gewas, ook in eventuele aanwezigheid van bodem/substraat gebonden pathogeen in het teeltsysteem, en mede door de activiteit van gunstige bodemmicro-organismen. Deze onderdrukking kan gerealiseerd worden door zowel concurrentie om substraat (antagonistisch), de vorming van microbiële afweerstoffen, de predatie van de schadelijke organismen of het stimuleren van de natuurlijke afweer van de plant.

In substraat en bodem zijn er tal van materiele stromen binnen het wortelmedium zelf en tussen medium en plantenwortels en microbiële biomassa (Figuur 1.2). De meest relevante stromen worden in dit project onderzocht en waar mogelijk gekwantificeerd: de focus ligt op enkele van de meest relevante microbiële processen in nutriëntenbeschikbaarheid en weerbaarheid: ten aanzien van de plantenvoeding is de stikstofbeschikbaarheid voor de plantengroei het belangrijkste. Dit betekent een focus op de microbiële omzetting van organische stikstof naar nitraat (in een aantal stappen). Ten aanzien van weerbaarheid focust het project op de afbraak van chitine-houdende stoffen (activiteit van exochitinase enzym) en aanwezigheid van enzymen die signaalstoffen van plantpathogene bacteriën kunnen afbreken (met *aiiA* lactonase als model enzym). Voor een uitgebreide toelichting op deze keuze en een verdere beschrijving van deze ziekteverende processen verwijzen we naar het projectrapport uit 2019 (De Visser *et al.*, 2020) en de appendix van het TKI-projectvoorstel.



Figuur 1.2 Globaal overzicht van de relevante functies en materiele stromen in het substraat.

Vollegrondonderzoek en publicaties in Nature laten zien dat een focus op activiteitsmetingen en functionele groepen beter toepasbare kennis over weerbaarheid levert dan een focus op individuele micro-organismen. Met organische meststoffen en toevoegingen worden functionele groepen bovendien stuurbaar. Daarom richt het project Wortelmilieu zich op het gebruiken van functionele groepen en activiteitsmetingen om weerbaarheid beter meetbaar, stuurbaar en voorspelbaar te maken, en gebruikt het project Wortelmilieu organische (mest)stoffen om de functionele groepen en hun activiteit te sturen.

De weerbaarheid zal per substraat en soort gewas mogelijk via verschillende microbiële processen gestuurd worden. Het project zal gefaseerd meerdere substraten en gewassen betrekken in het onderzoek om glastuinbouw-breed een advies te kunnen geven hoe in de praktijk in diverse teeltsystemen de weerbaarheid versterkt kan worden door inzet van micro-organismen.

1.2 Voorgaande bevindingen

In 2019 is een substraatproef uitgevoerd met een veenmengsel en toevoeging van organische meststoffen met o.a. N en K, in een vaste dan wel vloeibare vorm. Eveneens werden chitosan hydrochloride en biochar als toeslagstof getest, en werden drie vochniveaus in groeisubstraat opgelegd. De proef bestond uit een onderdeel zonder planten, gevolgd door een onderdeel met planten om de interactie met het wortel functioneren te bestuderen. De substraatproef liet zien dat de activiteit van bepaalde omzettingen sterk afhangt van de actuele waarden van temperatuur, watergehalte en zuurgraad van het wortelmedium. Zo werd bijvoorbeeld aangetoond dat het vrijkomen van ammonium uit organische meststoffen sterk beïnvloed wordt door de zuurgraad, terwijl de aanwezigheid van ammonium zelf ook weer invloed heeft op de zuurgraad. Ook de ammoniumomzettingen naar nitraat werden negatief beïnvloed door de verlaagde pH, waarschijnlijk doordat de pH suboptimaal werd voor de nitrificerders, wat tevens een gevolg is van de nitrificatie en zo een negatieve feedback is op dezelfde nitrificatie. Daarnaast was de nitrificatie lager als de aanvoer van organische voeding voor de betreffende micro-organismen verlaagde. De activiteit van de microbiële, functionele groep van chitine afbrekers, bepaald aan de hand van de potentiële activiteit van

chitinase, bleek hoger indien chitosan was gegeven. Bij toediening van de organische meststof Viscotec, een bron van chitine, nam de chitinase-activiteit langzamer af in dan in de behandelingen met een meststof zonder chitine (ECO-mix4). De potentiële chitinase activiteit nam af in de tijd, daarbij verliep de afname langzamer in de Viscotec behandeling, en sneller bij de aanwezigheid van een plant.

Uit de substraatproef in 2019 resteerden nog monsters voor de DNA-analyse. Deze monsters zijn in 2020 geanalyseerd m.b.v. qPCR. De resultaten daarvan worden in dit rapport gerapporteerd en gerelateerd aan de uitgevoerde behandelingen en vergeleken met de resultaten van de 2020 proef. De 2020 proef betrof een uitgebreide kasproef van komkommer met 4 proeffactoren; het substraattype (kokos of steenwol), type voeding (mineraal of biologisch), zes toeslagstoffen (chitine, chitosan, champost, rijpe compost, biochar, silicium), en ziektedruk (wel of geen toediening van *Pythium*). De substraatmetingen richtten zich op totale microbiële activiteit, gemeten als potentieel zuurstof gebruik, potentiële exochitinase activiteit en meting van minerale stikstofverbindingen (NH₄, NO₂ en NO₃). Aanwezigheid van vier relevante, functionele groepen van micro-organismen werd gemeten met qPCR's voor totale aanwezige hoeveelheid bacteriën (16S rDNA gen), nitrificatie (amoA gen), chitinase (chiA gen) en lactonase (aiiA gen). De planten werden onderzocht op bladgroei, nutriënten samenstelling en ziekte symptomen in wortel en groene delen.

In deze 2020 proef werd geen duidelijk verschil waargenomen in effect van gebruikte meststoffen (minerale vs. biologisch geproduceerd) op ontwikkeling van bovengenoemde functionele groepen van de bacteriën. Microbiële analyses lieten zien dat er een significante verschil is tussen substraattypes (kokos of steenwol) in: totale microbiële activiteit, potentiële exochitinase activiteit en aanwezigheid van functionele groepen van micro-organismen. In kokos substraat was er een hogere totale microbiële activiteit gemeten (als verbruikt O₂) dan in steenwol, terwijl potentiële exochitinase activiteit hoger was in steenwolmatten. Functionele, microbiële genen voor nitrificatie (ammoniak oxidatie- amoA gen), chitine afbraak (chiA gen) en lactonase (aiiA gen) waren in grotere aantallen aanwezig in steenwol substraat dan in kokos.

1.3 Doelstellingen van het experiment in 2021

Het doel van de hier gerapporteerde proef is om de invloed van toeslagstoffen op de weerbaarheid van het wortelmilieu tegen *Pythium aphanidermatum* en *Fusarium oxysporum* in komkommer te bepalen. Hiervoor is een kasteelt met komkommerplanten ingericht. Verschillende toedieningsniveaus van toeslagstoffen werden getoetst op hun invloed op substraatweerbaarheid tegen *Pythium* en *Fusarium* in een kasteelt van komkommer, door deze plantpathogenen in het begin van de teelt actief toe te dienen. Er werden zowel metingen aan de aanwezigheid (met qPCR) als de activiteit van de functionele groepen (met activiteitsmetingen), aan bodemchemie en -fysica als aan de plantgezondheid uitgevoerd.

1.4 Organisatie

De keuze voor het project Wortelmilieu, met nadruk op organische (mest)stoffen, was afkomstig van de Club van 100. Direct betrokken Club van 100 leden waren: Bram van der Maas voor Jiffy (Zwijndrecht); Arjen Zwinkels voor BVB-Kekila Substrates (Maasland); Peter Prins voor Floricultura (Heemskerk); Maartje Jung voor Royal Brinkman (s' Gravenzande); Paul Bouwens voor Grodan; Peter van Lexmond voor Meteor (Breda); Fred Kneppers voor Wayland (Bergschenhoek); Cultilene (Etten-Leur); Jan Hardenberg en Natasja Poot voor Eurofins (Wageningen); Thomas Verburg voor Cindro; Gerard Wapenaar voor Klasmann-Benelux (Schiedam); Karel de Bruin, Jeroen Jansen en Dirk Zwinkels voor van der Knaap Group (Kwintsheul). Namens Stichting KIJK was Helma Verberkt betrokken.

Vanuit Wageningen University & Research Glastuinbouw waren de volgende personen betrokken: Pieter de Visser als projectleider, Chris Blok en Marta Streminska als inhoudelijk planners voor wortelmedia en microbiologie en Barbara Eveleens, Nina Oud, Hui Ming Huisman en Gerdit Greve voor de uitvoerende werkzaamheden.

2 Aanpak kasproeven en rekentool

De proef is uitgevoerd met komkommers (cultivar: Proloog), gezaaid op 11 mei 2021 en opgekweekt in blokken (Cultilene). Op 26 mei werden de planten met blok ieder geplaatst op een 0.5 m lange steenwol mat (kas 3.07, 100 m²). De proef betrof een komkommerteelt met 3 proeffactoren; drie toeslagstoffen (vaste chitine, vaste champost, vloeibare champostthee), toedieningsniveau (laag of hoog, zie Tabel 2.1) en ziektedruk (toediening van *Pythium*, *Fusarium* of niets). Er werd minerale voeding gegeven, aangevuld met Viscotec om de micro-organismen van organisch substraat te voorzien. Er was geen recirculatie van het drainwater.

2.1 Kasproef: overzicht behandelingen

2.1.1 Behandelingen en plattegronden

Alle mogelijke combinaties van de factoren (3x2x3=18) inclusief een behandeling met minerale voeding en Viscotec maar zonder additief zowel met als zonder plant (1+1) en behandelingen met voeding en additief maar zonder ziekte-toediening (=4) werden in tienvoud uitgevoerd, en resulteerden dus in 240 aparte mat-plant combinaties.

Tabel 2.1 De 24 behandelingen met omschrijving van toeslagstof, toedieningsniveau en wel of geen *Pythium* of *Fusarium* (2 rechterkolommen) toegediend. Elke behandeling is in tienvoud uitgevoerd.

nr.	code	Behandeling	additief	niveau	Opmerking	Pythium	Fusarium
1	matx	geen plant - geen additief	geen		kale mat	-	-
2	negx	plant - geen additief	geen		neg controle - werking voeding	-	-
3	chHx	plant - champost hoog	champost	17.5g	werking additief champost	-	-
4	ctHx	plant - chitine hoog	chitine	5g	werking additief chitine	-	-
5	thHx	plant champostthee 5%	champostthee	5%	werking additief champ.thee	-	-
6	thctHx	plant- champostthee 5% en chitine hoog	champostthee en chitine	5% en 5g	werking additief champ.thee & chitine	-	-
7	posP	plant - geen additief	geen		pos controle - ziekte P	+	-
8	posF	plant - geen additief	geen		pos controle - ziekte F	-	+
9	chLP	plant - champost laag	champost	3.5g		+	
10	chHP	plant - champost hoog	champost	17.5 g		+	
11	ctLP	plant - chitine laag	chitine	1g		+	
12	ctHP	plant - chitine hoog	chitine	5 g		+	
13	thLP	plant - champostthee 1%	champostthee	1% van voeding	C voeding en microorganismes	+	
14	thHP	plant - champostthee 5%	champostthee	5% van voeding	C voeding en microorganismes	+	
15	thctLP	plant champostthee 1% en chitine laag	champostthee en chitine	1% en 1g		+	
16	thctHP	plant- champostthee 5% en chitine hoog	champostthee en chitine	5% en 5g		+	
17	chLF	plant - champost laag	champost	3.5g			+
18	chHF	plant - champost hoog	champost	17.5g			+
19	ctLF	plant - chitine laag	chitine	1g			+
20	ctHF	plant - chitine hoog	chitine	5 g			+
21	thLF	plant - champostthee 1%	champostthee	1% van voeding	C voeding en microorganismes		+
22	thHF	plant - champostthee 5%	champostthee	5% van voeding	C voeding en microorganismes		+
23	thctLF	plant champostthee 1% en chitine laag	champostthee en chitine	1% en 1g			+
24	thctHF	plant- champostthee 5% en chitine hoog	champostthee en chitine	5% en 5g			+

De proef is uitgevoerd in een enkele kas met per herhaling een steenwolmat van 0.5m lengte, geplaatst in een bak om beïnvloeding van omgevende behandelingen te vermijden. Op elke halve-meter mat bevond zich 1 komkommerplant. Het totaal van 240 mat-plant combinaties werd uitgespreid over 10 goten met ieder 24 afzonderlijke matten (Tabel 2.2).

Tabel 2.2 Plattegrond van de gebruikte kas. Elk blokje is één mat, waarop 1 komkommerplant staat. De 10 behandelingen zijn aangegeven met een kleur, code en nummer. Er zijn 4 rijen met *Fusarium* dan wel *Pythium* (F of P, zie bovenaan het schema). De twee randrijen zijn aangeduid met de letter 'r'. De code vermeldt toeslagstof (ch=champost; ct=chitine; th=champostthee), toedieningsniveau (L of H) en besmetting (P, F of x, waarbij x geen besmetting is).

	F	P		P	F					P	F		F	P		
r	chHx 21	posP 63		ctHP 115	chHF 175		matx 5	chHx 30		ctLP 108	thLF 208		thctLF 230	chHP 100		r
r	chLF 163	ctHP 113		chHP 95	thctHF 235		negx 15	thctHx 60		thctHP 157	ctHF 198		thLF 210	thHP 140		r
r	ctLF 182	chLP 83		thctHx 52	thctLF 225		chHx 26	thHx 50		thLP 127	posF 77		chHF 180	chLP 90		r
r	ctHF 192	thLP 122		thctLP 145	chHF 174		ctHx 34	negx 19		chHP 98	chHF 178		matx 10	ctLP 110		r
r	posF 72	ctLP 103		thHP 135	posF 75		thHx 46	matx 9		ctHP 118	thctHF 237		thctLF 229	thctLP 150		r
r	thLF 203	thctHP 152		ctLP 105	negx 11		thctHx 56	ctHx 38		thctLP 148	thHF 217		thctHF 240	posP 70		r
r	thctLF 223	thHP 132		chLP 85	ctLF 185		chHx 25	chHx 29		posP 68	chLF 168		ctHF 200	ctHP 120		r
r	thHF 212	posP 62		chHP 94	thHF 214		thHx 45	matx 8		ctLP 107	ctLF 188		chLF 170	thctHP 160		r
r	chHF 172	chHP 92		thLP 125	thHx 42		thctHx 55	thHx 49		thHP 137	ctHF 197		posF 80	thHP 139		r
r	thctLF 222	matx 1		thHP 134	ctHF 195		negx 14	negx 18		chLP 87	chHF 177		thHF 220	negx 20		r
r	ctHF 191	thctLP 142		posP 65	thctHF 234		ctHx 33	thctHx 59		thctHP 156	thLF 207		ctLF 190	thLP 130		r
r	posF 71	ctLP 102		ctHP 114	thLF 205		matx 4	ctHx 37		thLP 126	thHF 216		thctHF 239	ctLP 109		r
r	chLF 162	chLP 82		thctLP 144	chLF 165		negx 13	matx 7		thctLP 147	posF 76		chHF 179	thctHP 159		r
r	thctHx 51	ctHP 112		thLP 124	thHF 213		ctHx 32	thHx 48		ctLP 106	chLF 167		thHF 219	thLP 129		r
r	chHF 171	thHP 131		thctHP 154	posF 74		thctHx 54	thctHx 58		ctHP 117	thctHF 236		thctHF 238	chLP 89		r
r	thLF 202	thLP 121		thctLP 143	ctLF 184		matx 3	negx 17		posP 67	thLF 206		ctHF 199	chHP 99		r
r	thctHF 233	posP 61		ctLP 104	chHF 173		chHx 24	matx 6		thctHP 155	thctLF 227		thctLF 228	thctLP 149		r
r	ctLF 181	thctHP 151		chHx 22	posF 73		thHx 44	ctHx 36		chHP 97	ctLF 187		ctHx 39	ctHP 119		r
r	thLF 201	thHx 41		thLP 123	ctLF 183		negx 12	thHx 47		chLP 86	chHF 176		thLF 209	posP 69		r
r	thctLF 221	ctLP 101		chHP 93	chLF 164		matx 2	chHx 28		ctHP 116	ctHF 196		ctLF 189	thctHP 158		r
r	chLF 161	chHP 91		chLP 84	ctHF 194		ctHx 31	negx 16		thHP 136	thHF 215		posF 79	thLP 128		r
r	thctHF 232	ctHP 111		posP 64	thctLF 224		chHx 23	thctHx 57		posP 66	chLF 166		posF 78	chLP 88		r
r	thctHF 231	chLP 81		thHP 133	thLF 204		thctHx 53	ctHx 27		chHP 96	thctLF 226		thHF 218	ctHx 40		r
r	thHF 211	thctLP 141		thctHP 153	ctHF 193		thHx 43	ctHx 35		thctLP 146	ctLF 186		chLF 169	thHP 138		r
								Deur								

2.1.2 Substraat en fertigatie

Het substraat bestond uit steenwol (Grodan Expert). De komkommerplanten werden gezaaid en opgekweekt in vierkante blokken steenwol, en na 3 weken geplaatst op de mat (zie ook §2.2).

In Tabel 2.3 staat een overzicht van de minerale voeding.

Tabel 2.3 Samenstelling van de minerale voeding met een EC van 2.5.

	eenheid	Concentratie
VISCOTEC	g/L	0.4
EC		2.5
pH		6.2
NH ₄	mmol/L	0.9
K	mmol/L	8.3
Na	mmol/L	0.2
Ca	mmol/L	4.4
Mg	mmol/L	1.4
NO ₃	mmol/L	16.8
Cl	mmol/L	0.1
SO ₄	mmol/L	1.7
HCO ₃	mmol/L	0.3
P	mmol/L	1.29
Si	mmol/L	0.01
Fe	µmol/L	12
Mn	µmol/L	9.3
Zn	µmol/L	4.9
B	µmol/L	21
Cu	µmol/L	0.8
Mo	µmol/L	0.4
C organisch	mg C/L	

Eenzelfde minerale voeding werd gebruikt tijdens de opkweek op de blokken en tijdens de groei op de matten, zodat de planten na planting niet aan een wijziging in voeding werden blootgesteld. Tijdens de opkweek werd een eb en vloed systeem gebruikt en op de matten druppelirrigatie. De minerale voeding werd via de voedingsunit in Bleiswijk aangemaakt uit vloeibare chemische meststoffen. Het streef drainpercentage was 40% en het drainwater werd niet hergebruikt voor deze teelt (vrije drainage oftewel geen recirculatie). De minerale voeding werd aangevuld met vloeibare organische Viscotec Blue (NPK 9-0-5) (DCM, Nederland, Katwijk) om extra koolstof en organisch stikstof, in de voeding te krijgen. De NH_4^+ , NO_3^- en kalium in de standaard komkommervoeding zijn evenredig verlaagd omdat deze elementen ook aanwezig zijn in Viscotec.

Bij aanvang van de proef werd 0.2 g/L Viscotec in de voeding gebruikt. Na een week is dit verhoogd naar 0.4 g/L voeding. Bij het wekelijks stapsgewijs verhogen van de Viscotec concentratie ging de pH steeds verder omhoog. Er werd besloten het maximum van 0.6 g/L Viscotec aan te houden aangezien daarmee voldoende organische stof geleverd werd voor de micro-organismen zonder dat de pH schadelijk zou zijn voor de plantenwortels.

De voedingsbak in de corridor werd vanaf juni 1 keer per week met peroxide gereinigd omdat er biofilm in de bak ontstond. Dit kwam door de Viscotec gecombineerd met warmte. De bak werd 1 keer per week opnieuw aangemaakt.

Vanaf begin augustus tot aan het einde van de proef eind augustus is de Viscotec met de hand toegediend (0.6 g/L) omdat druppelaars en filter in de voedingsbak dichtgeslibd waren. Er is een oplossing Viscotec aangemaakt met voldoende Viscotec (voor 2 of 3 dagen) omgerekend naar 0.6 g/L voeding. Hiervan is 200 ml aan de planten toegediend per twee of drie dagen.

2.2 De factor toeslagstof

2.2.1 Champostthee

De toeslagstof champostthee werd wekelijks bereid door 24-48 uur borrelen van 1 volume deel champost in 4 volume delen water en waarna de vloeistof werd afgefilterd. De thee werd vervolgens handmatig aangegoten aan de steenwolmat met een hoeveelheid van 1%-v/v van de voeding voor de behandelingen met champostthee laag en 5%-v/v van de voeding voor de behandelingen met champostthee hoog (zie Tabel 2.4 voor hoeveelheden per plant). De concentratie opgeloste koolstof en totale stikstof werden eenmalig bepaald via een analyse van TOC (Total Organic Carbon) en total-N bij Eurofins.

2.2.2 Vaste champost en chitine

De toeslagstof De 2 vaste stoffen: Champost (afkomstig van Kooter, Hazerswoude) en Chitine (Sigma C9213) werden respectievelijk als vezel en als fijn gemalen poeder toegediend. De stoffen werden gelijkmatig verdeeld bij de start tussen steenwolblok en steenwolmat na plaatsing van het blok in de kas (Figuur 2.1). Per stof betrof het 2 toedieningsniveaus (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**4).

Tabel 2.4 Hoeveel toeslagstof, nat gewogen, en per plant toegediend (overeenkomend met 3.5 mm dikte).

Toeslagstof	Hoeveelheid per plant
Chitine laag/hoog	1 / 5 gram
Champost laag/hoog	3.5 / 17.5 gram
Champostthee laag/hoog	1% / 5% van voeding



Figuur 2.1 De vaste toeslagstoffen: links chitine en rechts champost.

2.3 De factor ziekte: *Pythium* of *Fusarium*

Pythium aphanidermatum werd opgekweekt in steriel, vloeibaar V8-medium [samenstelling: V8 groentesap, 20%; CaCO₃, 2,5 g/L] en werd 3 juni 2021, 3 dagen nadat de proef was gestart, geoogst en toegediend. Bij elke plant werd 10 ml *Pythium* sporenoplossing gepipetteerd (in totaal 50.000 oösporen/plant) tussen de mat en het steenwolblok waar de plant in staat.

Fusarium oxysporum f. sp. radicum-cucumerinum is opgekweekt in Czapek Dox vloeibaar medium en toegediend als sporensuspensie tot eindconcentratie van 10⁵ sporen/mL steenwol).

2.4 Metingen aan substraat en gewas

In dit hoofdstuk zijn in het kort de metingen gesproken. Voor een uitgebreide omschrijving van de methode zijn protocollen opvraagbaar.

2.4.1 Bemonstering substraat voor microbiologische analyse

Op 31 mei 2021 werden de planten naar de proef kas overgeplaatst, waarna 2 meetmomenten voor microbiologische analyses van het substraat volgden:

1. Bij de start van de proef (31 mei), direct voordat de *Pythium* en *Fusarium* toediening plaatsvond;
2. 5 weken na de start van de proef (2-5 juli);
3. Per meetmoment werden per behandeling telkens 3 verschillende matten bemonsterd voor microbiologische analyses. Met een appelboor werd op 4 plaatsen per mat bemonsterd (Figuur 2.2) om zo een representatief monster per mat te krijgen. Voor verdere informatie over de bemonstering zie De Visser *et al.* (2020).



Figuur 2.2 Bovenaanzicht mat. Witte stippen: bemonstering plekken met appelboor, groen: 2 planten, beige: mat opening bij plant waar toediening plaatsvindt.

2.4.2 Substraat voeding

Op wortelmedia monsters werd eens per 2 weken per behandeling een nutriëntenanalyse direct uit de steenwol mat genomen en door Eurofins geanalyseerd. Met een 50 ml spuit werd op 2 plekken een watermonster uit de steenwol mat getrokken en een mengmonster gemaakt van verschillende matten per behandeling.

Wekelijks werd een gift en drain monster genomen voor een nutriënten analyse en werd een monster per behandeling uit de mat gehaald om de NH_4 , NO_3 , NO_2 , EC, pH te volgen. Met behulp van test strips (Quantofix) kon direct de concentratie NH_4 , NO_3 en NO_2 in het voedingswater gemeten worden. Verder werd het vochtpercentage (vocht%) in de mat gemeten.

Direct uit de mat werd ook een watermonsters getrokken voor de bepaling van totale opgeloste koolstof (TOC analyse) en totaal N. Deze bepalingen werden voor de twee behandelingen gedaan met de laagste en hoogste verwachte C en N concentraties. Gedurende de proef werden deze bepalingen op 5 meetmomenten uitgevoerd. De monsters zijn door een 0.22 μm filter gehaald voordat de monsters werden opgestuurd voor analyse door Eurofins.

De uitkomsten van de voedingsanalyse en totale koolstof en stikstof werden weergegeven per liter. Deze liter is hetzelfde als liter bodemvocht. Voor de nutriënten is gekozen om het verloop gedurende de proef weer te geven per liter bodemvocht. Het vocht% gedurende de proef varieert. Voor de totale hoeveelheid koolstof en stikstof is gekozen om deze uit te drukken in een vast volume, namelijk per L substraat.

2.4.3 Gewas

Na beëindiging van de proef zijn blad monsters genomen voor een analyse van de macro-elementen N, P, K, Ca en Mg, en de micro-elementen ijzer, mangaan en borium, aanwezig in het blad.

2.5 Metingen van microbiële activiteit en van DNA van functionele groepen

De monsters voor directe (enzymen) of verdere analyse zijn op de volgende tijdstippen in de 2021 proef genomen:

Bepaling	Monstername op:
OUR	5 juli, einde proef
Chitinase enzymactiviteit	31 mei, 5 juli
Bemonsteren voor DNA extractie	31 mei, 5 juli
qPCR voor verschillende functionele genen	31 mei, 5 juli

Hieronder volgen de details van monsterring en analyse per bepaling.

2.5.1 OUR-metingen

De afbreekbaarheid van de substraten is getest in een aangepast 'oxygen uptake rate' test (OUR), waarin de maximale zuurstofopnamesnelheid wordt gemeten onder omstandigheden die ideaal zijn voor microbiële afbraak (CEN 16087-1, 2011). Voor deze proef zijn monsters van de matten genomen en 'in situ' in een OUR test gemeten. Voor overige informatie zie voorgaand projectrapport (De Visser *et al.*, 2020).

2.5.2 Chitinase-activiteit

Exochitinases zijn enzymen, die een rol spelen in afbraak van chitine. Substraten van deze enzymen zijn meestal producten van initiële hydrolyse van chitine door endochitinases (GH familie 18 en 19, zoals chitinase chiA). Bij het meten van de exochitinase activiteit is gebruik gemaakt van een kit van Sigma-Aldrich (CS1030). De methode van deze kit is gebaseerd op de enzymatische hydrolyse van chitinase substraten. De enzymatische hydrolyse maakt 4-methylumbelliferone (4MU) vrij, die bij ionisatie in een basische pH oplossing, fluorimetrisch gemeten kan worden bij een excitatie golflengte van 360nm en een emissie golflengte van 450nm. De kit voorziet in verschillende chitinase substraten en wij hebben gekozen voor het meten van de exochitinase activiteit (β -N-acetylglucosaminidase activiteit). Hierbij wordt het substraat, 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide, gebruikt.

Activiteit van exochitinase enzym uit het monster wordt gemeten als de potentiële activiteit, dat is de activiteit die gerealiseerd zou worden onder de optimale omstandigheid voor dit enzym (overmaat aan substraat, juiste pH en temperatuur). De enzymen maken uit het enzymsubstraat (4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide) een stofje vrij (4-methylumbelliferone; 4-MU) wat gemeten wordt met een fluorescentie-detector. De hoeveelheid stof die vrij wordt gemaakt kan gekwantificeerd worden door een ijklijn (met bekende concentraties 4-MU) tegelijkertijd te meten en de uitkomsten van de monsters daar tegen af te zetten. 1 unit (U) van chitinase activiteit maakt 1 μ mol 4-MU/min vrij uit enzymsubstraat bij pH=5 bij 37°C. De uiteindelijke chitinase activiteit wordt weergegeven als nmol 4-MU/min.

De hoeveelheid chitinase activiteit, die potentieel aanwezig is in de substraatmatten (steenwol of kokos), die bemonsterd zijn, wordt na omrekening met vochtgehalte en bulkdichtheid weergegeven in nmol 4-MU/min/cm³ vers substraat. Voor informatie over het protocol zie voorgaand projectrapport (De Visser *et al.*, 2020).

2.5.3 DNA-extractie

De monsters, die genomen zijn uit de substraatmatten op de drie verschillende tijdstippen, zijn bewaard bij -80°C tot aan het analysemoment. Voor DNA-extractie zijn de monsters bij 40°C gedroogd en gemalen. Voor elk type substraat is de DNA-extractie methode met de Qiagen DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit uitgetoetst en aangepast. Voor gedetailleerde werkprotocollen, zie voorgaand projectrapport (De Visser *et al.*, 2020). Uiteindelijk wordt er 100 μ l eluaat verkregen dat opgeslagen worden bij -20°C waarmee verdere DNA-analyses uitgevoerd worden.

Om de DNA-extractie efficiëntie te bepalen zijn er van elke behandeling per substraat extra monsters meegenomen door de hele extractie procedure heen. Aan deze monsters is een bekende hoeveelheid marker-bacterie (*Rhizobium rhizogenes* NCPB4043; met Ri plasmide) toegevoegd, voor de stap van drogen in DNA extractie. Deze bacteriën bezitten een gen (VC3) op hun Ri plasmide, dat specifiek is voor deze bacteriën en van nature niet voorkomt in onderzochte substraten. Zo wordt bewaakt of er in de procedure nog verliezen optreden of niet.

2.5.4 qPCR analyses

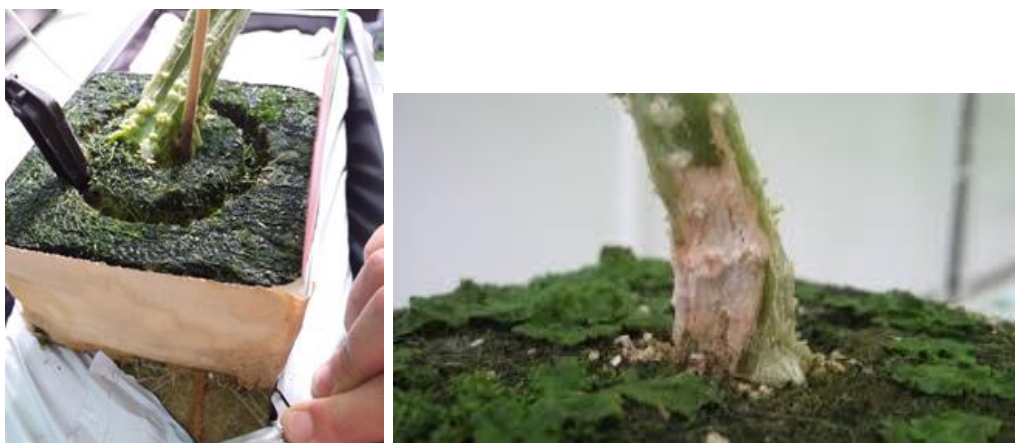
Een qPCR analyse wordt uitgevoerd om de hoeveelheid functionele genen te meten. De methode begint door uit kleine hoeveelheden DNA (enkele basen) specifiek een of meer gedeeltes te multipliceren (amplificeren) tot er genoeg van is om het te analyseren. Voor de gebruikte verdunningen en verdere details wordt verwezen naar ons voorgaande rapport (De Visser *et al.*, 2020).

2.6 Metingen ziekteontwikkeling in 2021

Op 8 juli 2021, vijf weken na de start van de proef, werden de eerste lichte symptomen van aantasting zichtbaar in zowel met *Pythium* (bij wortels) als met *Fusarium* (bij stengel en blad) geïnfecteerde planten. Vanaf deze week werd elke plant wekelijks beoordeeld op de ziekteontwikkeling. Voor *Pythium* werd voor elke plant een ziektescore index gegeven met een schaal van 0 (gezond) t/m 3 (volledig verwelkte plant) voor de mate van aantasting aan de buitenkant van de stengel en eventuele verwelking van de planten (zie Figuur 2.3). Voor *Fusarium* zijn de ziekte scores op vergelijkbare wijze als voor *Pythium* gescoord, resulterend in een *DSI- disease severity index*. Enkele zwak tot sterk door *Fusarium* aangetaste planten zijn te zien in Figuur 2.4.



Figuur 2.3 Ziektescore index voor beoordeling van *Pythium* infectie in komkommer. 0=gezonde plant (niet weergegeven); 1=voertrot zichtbaar; 2=aantasting is verderop in de stengel zichtbaar; 3=de gehele plant is verwelkt.



Figuur 2.4 Planten licht (links) tot matig (rechts) aangetast door *Fusarium*.

2.7 Metabarcoding van het microbioom in de groeimedia

Sequencing en bioinformatische analyse van bacteriële microbioom in de monsters uit verschillende proeven was uitgevoerd door Eurofins Genomics B.V. Analyse was uitgevoerd met behulp van Illumina MiSeq sequencing. Variabele regio van 16S rDNA gen (V3-V4) was gekozen voor de analyse. PCR producten zijn geproduceerd met primer set: fwd: TACGGGAGGCAGCAG en rev: CCAGGGTATCTAATCC (Turner *et al.*, 1999; Kisand *et al.*, 2002). Schimmel metabarcoding was uitgevoerd op basis van sequenties van IT2 genITS2 met primer set: fwd: GCATCGATGAAGAACGCAGC en rev: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990).

2.8 Opzet rekentool

Om de gevolgen van organische additieven op het wortelmilieu te voorspellen is een rekentool ontwikkeld. Het kasklimaat en abiotische substraatcondities van de kasproef in 2021 zijn in de rekentool als input gebruikt. Vervolgens zijn de gemeten substraatconcentraties van een bemestingsproef bij Van der Knaap gebruikt om de uitkomsten van de rekentool te verifiëren. Hieronder wordt de theoretische achtergrond van de rekentool beschreven, en worden vervolgens de rekenregels gepresenteerd.

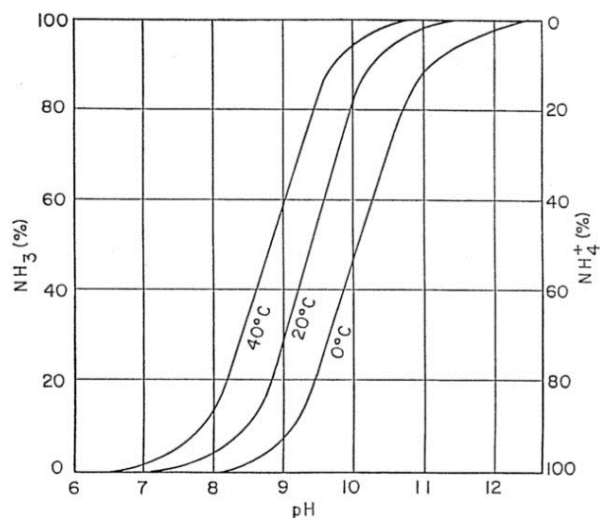
2.8.1 Substraatprocessen: van functionele groepen naar rekenregels

Plantenvoeding:

Het uiteindelijke doel van ons wortelmilieu-onderzoek is kennis vergaren over het effect van het wortelmilieu op de plantengroei en productie. De plantenvoedingsaspecten betreffen daarbij vooral (1) de water- en nutriëntenvoorziening, (2) de wel of niet aanwezige abiotische stress, (3) de biotische invloed van het bodemleven (microflora en -fauna) op punten 1 en 2. De drie punten zijn verweven met elkaar, en laten ook een interactie zien met de optredende wortelgroei. Figuur 1.2 in de Inleiding laat deze verwevenheid zien. Als een deel of het geheel van anorganische voeding wordt vervangen door organische meststoffen, is de afbraak en eventuele transformatie van die organische voeding grotendeels afhankelijk van het bodemleven. De afbraak wordt door een veelheid aan microbiële soorten bewerkstelligd. Met het concept "functionele groepen" van micro-organismen kunnen we de vele soorten ordenen en groeperen, in bijvoorbeeld bepaalde koolstof- of eiwitsubstraten afbrekende functies (Figuur 2.6). Vervolgens zijn er -mogelijk- DNA en enzymen van zo'n proces bekend en kan dit in het substraat gemeten worden (zoals voor nitrificatie, zie Figuur 2.7). Hiermee is dan in principe een rekenregel te bouwen en kan het proces gekwantificeerd worden in een rekentool. Zo'n model is in principe te maken voor afbraak van stikstofhoudende organische stof, bijvoorbeeld de meststof luzerne, want er is bekend welke functionele groepen hierbij betrokken zijn: van eiwitstikstof → ammoniak → hydroxylamine → nitriet → nitraat (Figuur 2.7). Dit proces is afhankelijk van de abiotische factoren temperatuur, watergehalte en zuurgraad, en natuurlijk de aantallen micro-organismen van die functionele groepen. De omzetting van al die betrokken stoffen afzonderlijk is erg moeilijk te kwantificeren. Zo is de verhouding tussen ammoniak en ammonium afhankelijk van de pH die weer ruimtelijk verschilt in de bodemmatrix, en voor zo'n gedetailleerde aanpak (zie kader over pH) zijn in de praktijk te weinig metingen en getallen beschikbaar.

pH bepaalt of er ammoniak (=substraat voor nitrificatie) dan wel ammonium is:

Bij afbraak van organisch stof komt NH_3 vrij, die vervolgens in lagere pH na het oplossen in het water NH_4^+ wordt. In de proef in 2021 hebben wij nagenoeg geen NH_4 gemeten, dus dat betekent dat, die: a) überhaupt weinig gevormd wordt; b) heel snel opgenomen wordt door micro-organismen (maar dan niet voor nitrificatie, maar als bouwstof van biomassa). En eigenlijk bij de pH in het systeem (onder 7) zou ik verwachten dat er niet zo veel ammoniak wordt gevormd (of is pH hoger in microniches??; maar dat hebben wij niet kunnen meten).



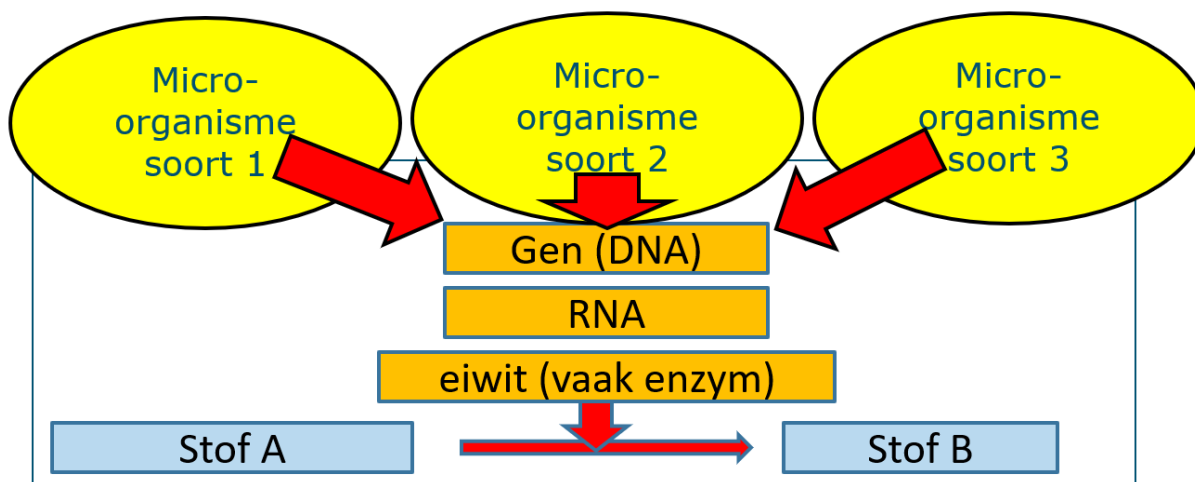
Figuur 2.5 Effecten van pH en temperatuur op de verhouding tussen ammoniak (links) en ammonium (rechts) in water.

Voor nitrificatie is NH_4^+ niet nodig, wel NH_3 . Sterker nog, nitrificerende bacteriën kunnen NH_4^+ niet oxideren, daarom gaat nitrificatie in bodems met lage pH zo moeizaam (veel ammonium, weinig ammoniak). Ammoniak (NH_3) wordt direct geoxideerd naar hydroxylamine (zie hieronder) en verder naar NO_3 met behulp van verschillende microbiële enzymen:

De eerste stap van NH_3 na hydroxylamine (NH_2OH) blijkt heel vaak de meest beperkend te zijn voor nitrificatie. Wij hebben met qPCR *amoA* gemeten. Er zitten dus nitrificerende bacteriën in, maar de aantallen zijn niet heel groot: rond 10^5 kopieën *amoA*; ten opzichte van 10^{10} kopieën 16S rDNA (voor alle bacteriën).

Rekenmodel:

Afhankelijk van de beschikbare kennis, kan een rekenregel of -model van het proces en de verwachte substraatomstandigheden variëren van een enkele vuistregel tot -bij veel kennis- een verklarend computermodel dat processnelheid en outputs genereert in een tijdreeks. Vaak is van bodem of substraat alleen de input en output van een geheel van processen -zoals nitrificatie- bekend en worden de tussenstappen in het proces samengevoegd. Zo'n zogenaamde black box benadering werkt 'slechts' met conversiefactoren of omzettingcoëfficiënten, welke proefondervindelijk -empirisch- worden bepaald in proeven. Die benadering vormt vaak de eerste stap in modelontwikkeling, en die is gebruikt in onze rekentool voor beschrijving van de omzetting van koolstof en stikstof in organische (mest)stoffen in ammonium en nitraat (zie §2.8.2). Zulke empirische rekenmodellen zijn meestal alleen geldig voor de specifieke condities waarvoor de conversiefactoren zijn bepaald. Meer algemeen geldige modellen bevatten meer factoren en parameters die meerdere situaties beschrijven, maar die behoeven alsnog testen en kalibraties voor die uiteenlopende situaties. Die modellen vielen buiten het bestek van dit onderzoek.



Figuur 2.6 Een functionele (microbiële) groep bestaat uit meerdere soorten micro-organismen en wordt gekenmerkt door een bepaalde functie, zoals hier de omzetting van een hypothetische stof A naar B waarvoor specifieke genen en daarmee gebouwde enzymen verantwoordelijk zijn.

	Stof A	→	Stof B	=Enzymactiviteit	DNA	Meting
1	Chitine		verschillende	Chitinase	chiA	qPCR, Enzym
2	AHL		verschillende	verschillende	aiiA	qPCR
3	orgstof-NH ₂		Ammonium	Deaminase	verschillende	1:1.5
4	Ammoniak		Hydroxylamine	Ammonia monooxygenase	amoA	qPCR
5	Hydroxylamine		Nitriet	HA oxidoreductase	hao	strookjes
6	Nitriet		Nitraat	Nitriet oxidoreductase	nxA	1:1.5 en strookjes

} Nitrificatie

Figuur 2.7 Microbiële omzettingen van stoffen relevant voor weerbaarheid tegen plantpathogenen (1: stof chitine), afremmen signaalstoffen (2: AHL) en nitrificatie (regels 3 tot 6), zeer relevant voor de stikstofvoorziening van de plant. Het proces is traceerbaar (welk enzym, welk gen) en meetbaar, en dus in principe kwantificeerbaar.

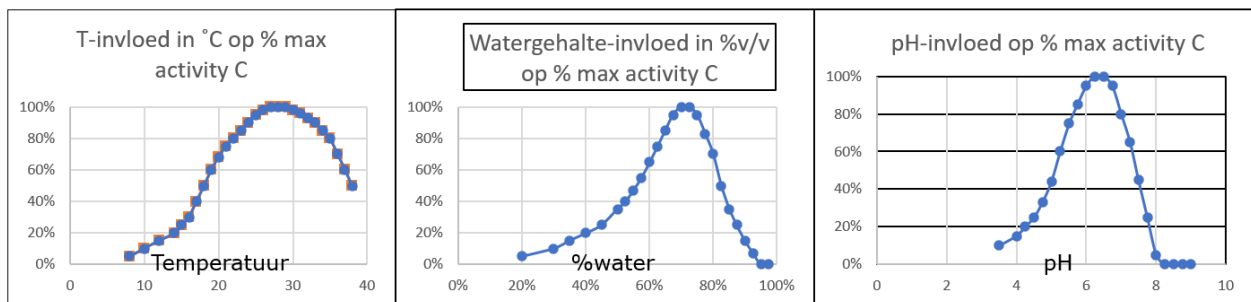
Rekenen aan invloed van wortelmilieu op plantenziekten en -weerbaarheid:

De rol van microflora en -fauna in bodem en substraat voor plantengroei en -gezondheid wordt in toenemende mate duidelijk. Het wetenschappelijke onderzoek heeft hierbij de laatste jaren een enorme impuls gehad door het inzetten van genetische tools als qPCR en metabar-coding. Momenteel is het hiermee al meetbaar welke microbiële groepen in een bepaald wortelmilieu aanwezig zijn en bij welke processen zij betrokken zijn. Deze groepen kunnen ingedeeld worden in functionele groepen, om zo te bepalen welke functies er significant aanwezig zijn in dat wortelmilieu. Aanvullende, andere meetmethoden kunnen dan weer de grootte/intensiteit van die functie aangeven, bijv. de mate waarin melkzuur wordt omgezet. Kan een rekentool die processen voor een teler voorrekenen om de weerbaarheid van zijn teelt te voorspellen? Wel als er ook gelijktijdig veel gemeten wordt. Voor de rol van chitine afbrekende micro-organismen hebben we in dit onderzoek een poging gedaan door te meten en te voorspellen. De uitdaging was om de ziekteverendigheid tegen *Pythium* en *Fusarium* te voorspellen d.m.v. het vooraf meten van karakteristieken van het microbiom, het monitoren van aanwezig & gegeven chitine, en van het abiotisch wortelklimaat.

2.8.2 De Rekentool

Op basis van de achtergrondkennis van microbiële processen in bodem of substraat, aangevuld met meting van die processen in het relevante wortelmilieu, is het mogelijk objectieve rekenregels op te stellen. Dan is het mogelijk om de invloed van een bepaald gemeten wortelklimaat op de groei en/of ziekteverendheid aan te geven. Die regels kunnen dan in de praktijk toegepast worden om die processen te voorspellen en te stimuleren of af te zwakken.

Zoals vermeld in §2.8.1 is onze Rekentool ontwikkeld voor de afbraak van organische koolstof en stikstof naar de minerale vormen. Daarbij kunnen de volgende abiotische invloeden worden gekwantificeerd: temperatuur, watergehalte en zuurgraad (pH). Dit zijn altijd niet-lineaire relaties waarin zich een enkel optimum bevindt (Figuur 2.8). De activiteit van de afbraak is vervolgens te berekenen door de vermenigvuldiging van de activiteit van de 3 genoemde invloeden: $act(allen) = act(T) \times act(water) \times act(pH)$



Figuur 2.8 Relatie tussen abiotische factoren in het wortelklimaat en de activiteit van koolstofomzetting.

De hoeveelheid die per tijdstap (hier 1 dag) wordt afgebroken is afhankelijk van zowel activiteit als hoeveelheid substraat. Die voorraad substraat wordt dagelijks bijgehouden door de rekenregel $C\text{-voorraad} = C\text{-restand vorige dag} + \text{dagelijkse aanvulling door bemesting}$. De dagafbraak is dan $C\text{-voorraad} \times act(allen)$, en het resulterende $C\text{-restand} = C\text{-voorraad} - C\text{-afbraak}$.

De Rekentool is mogelijk ook uit te breiden met voorspellen van de weerbaarheid van het wortelmilieu tegen plantpathogenen. In een eerste stap hebben we hiervoor de aantallen chitine-afbrekende micro-organismen bepaald (CHI-aantal) en op enkele momenten in de proef ook de enzymactiviteit (CHI-activiteit) en het abiotisch wortelklimaat. Tevens is de mate van Pythium- en Fusarium-symptomen aan de plant bepaald. Als er genoeg data zijn kan de empirische rekenregel er zo uit zien:

$$\text{Weerbaarheid} = \text{CHI-aantal} \times \text{CHI-activiteit}(T, \text{water}, \text{pH})$$

Een model of rekenregel biedt inzicht in een proces en kan mogelijk voorspellingen doen, maar is altijd een versimpeling van de werkelijkheid. De proeven zullen uitwijzen of deze modelaanpak kan werken.

Het uiteindelijke doel van de rekentool is idealiter:

1. Teler inzicht geven in:
 - a. Actuele microbiële activiteit
 - b. Totale functionele groep
 - c. Invloed voedingsbronnen
 - d. Invloed abiotische factoren (T, pH, watergehalte en zuurstof)Elk van bovenstaande punten betreft een sleutelbegrip in het functioneren van het wortelmilieu.
2. Teler feedback aanreiken op basis van metingen
3. Teler helpen de metingen te interpreteren
4. Teler helpen correctieve acties te herkennen

3 Resultaten kasproef 2021

De proef is uitgevoerd met komkommers (cultivar: Proloog), gezaaid op 11 mei 2021 en opgekweekt in blokken (Cultilene). Op 31 mei 2021 werden de planten met blok geplaatst op steenwol matten (in kas 6.08, 144 m²). De proef betrof een komkommerteelt met 3 proeffactoren; type toeslagstof/additief (chitine, champost, champostthee), niveau chitine (laag/hog) en type ziekte (*Fusarium* of *Pythium*). Ter vermindering van de overdracht van de ziekte aan naburige behandelingen is ervoor gekozen in alle behandelingen te werken zonder recirculatie van het drainwater.

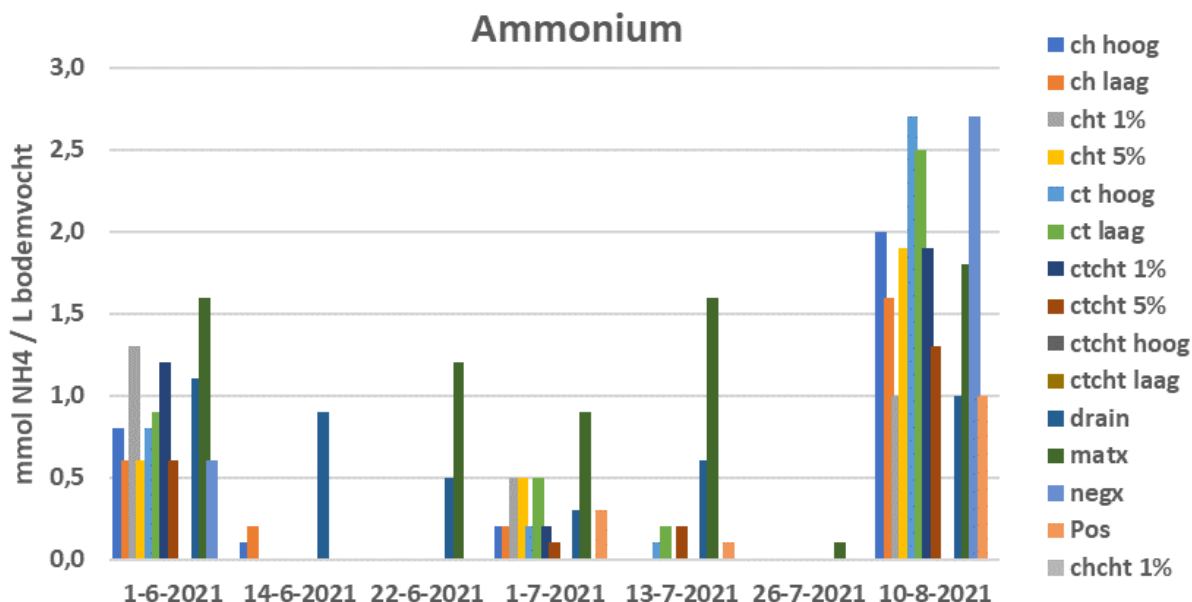
3.1 Resultaat metingen substraat en gewas

3.1.1 Substraat

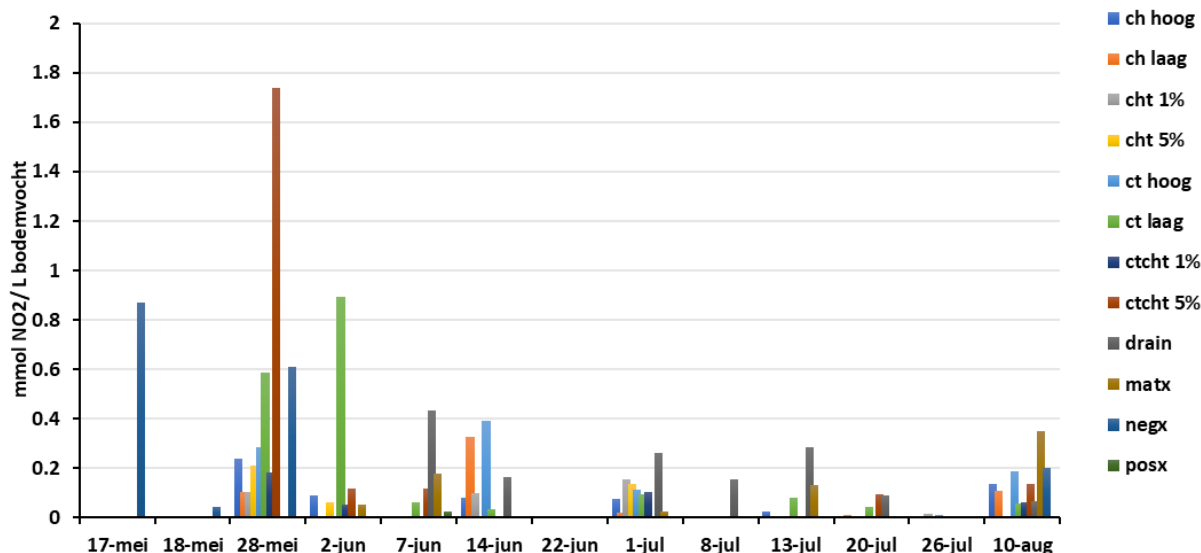
In het substraat is de ammonium concentratie rond 1 mmol/l en neemt daarna af (Figuur 3.1). De omzetting van NH₄ door MO lijkt aan het begin van de proef nog op gang te moeten komen. Aan het einde van de proef is de concentratie ammonium verhoogd aanwezig. Waarschijnlijk komt dit doordat aan eind proef relatief meer ammonium is toegevoegd met de voeding.

De nitriet concentratie in het substraat is rond eind mei hoger (Figuur 3.2). Het lijkt erop dat de omzetting van ammonium naar nitriet sneller verloopt dan omzetting nitriet naar nitraat. Er zijn meer micro organisme aanwezig die NH₄ omzetten naar NH₂. Het lijkt erop dat nitrificeren bacteriën die NO₂ omzetten naar NO₃ zich nog meer moeten ontwikkelen rond eind mei.

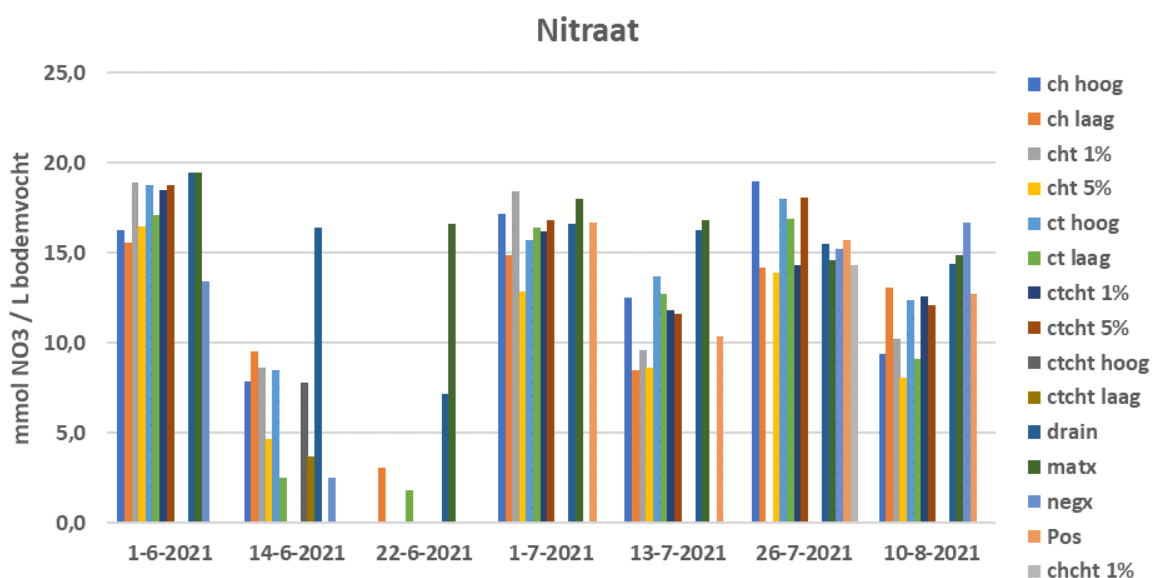
De nitraat concentratie is in het substraat eind juni laag (Figuur 3.3). Op dit moment werden de planten groot en werd vermoedelijk veel nitraat door de plant opgenomen.



Figuur 3.1 Ammoniumconcentratie (mmol l⁻¹ bodemvocht) gedurende de teelt in de behandelingen met toeslagstof (c...), zonder plant (matx), zonder toeslagstof zonder (negx) of met ziekte-inbreng (Pos).



Figuur 3.2 Nitriet concentratie (mmol l^{-1} bodemvocht) gedurende de teelt in de behandelingen.

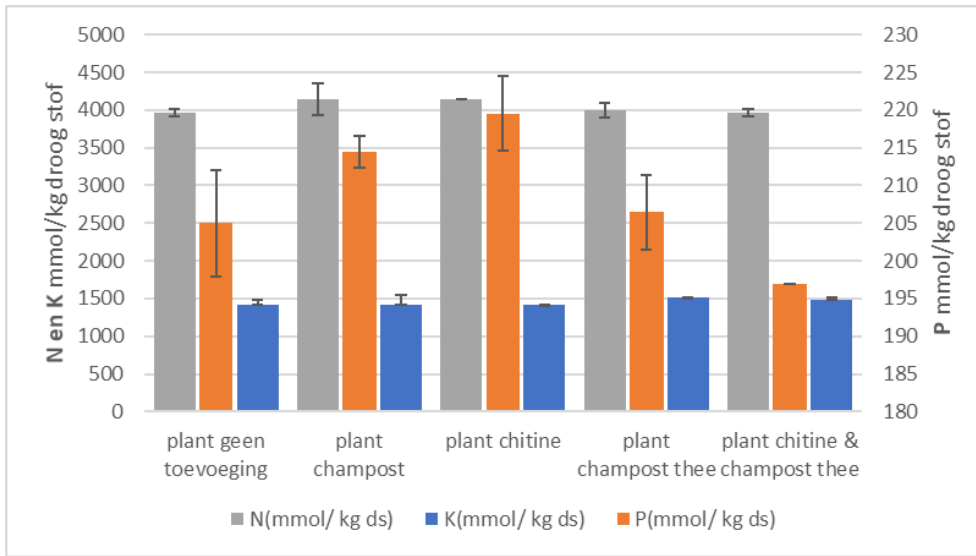


Figuur 3.3 Nitraat concentratie (mmol l^{-1} bodemvocht) gedurende de teelt in de behandelingen.

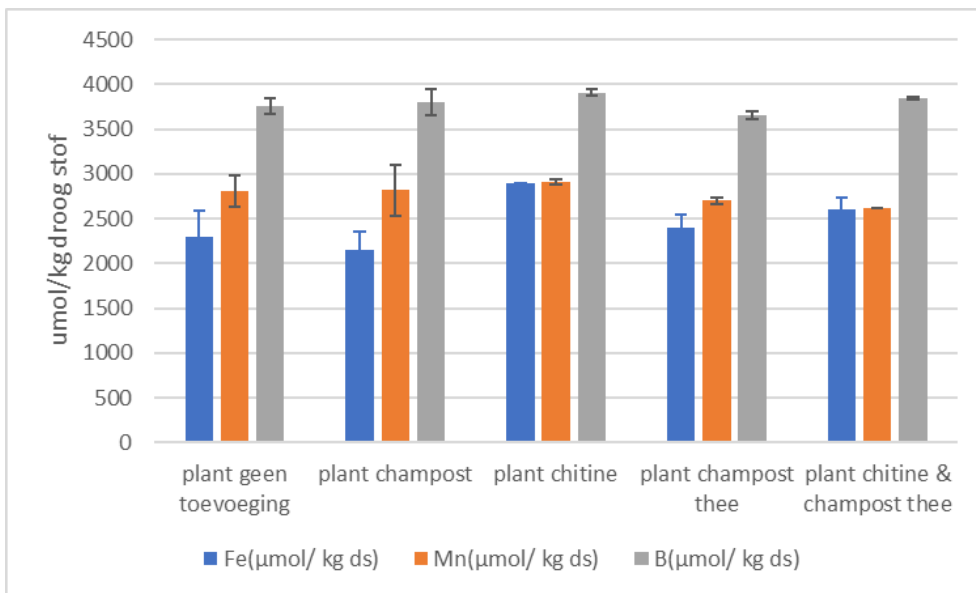
3.1.2 Gewas

In het gewas zijn aan het einde van de teelt bladmonsters verzameld voor een elementenanalyse. De elementen stikstof en kalium zijn vergelijkbaar tussen de behandelingen maar de element fosfor toont wel verschillen (Figuur 3.4); met hogere fosfor (+30-40%) in de behandelingen met champost ten opzichte van onbehandeld plant en chitine en een lagere concentratie (-40%) in de behandeling met champost thee en chitine ten opzichte van onbehandeld plant.

De micro-elementen ijzer, mangaan en borium zijn redelijk constant (Figuur 3.5).



Figuur 3.4 Elementenconcentratie in droog blad materiaal (mmol element/ kg drogestof) aan het einde van de proef. Linkeras stikstof en kalium en rechteras fosfor. $n=2$. Lijnen geven standaard deviatie aan.



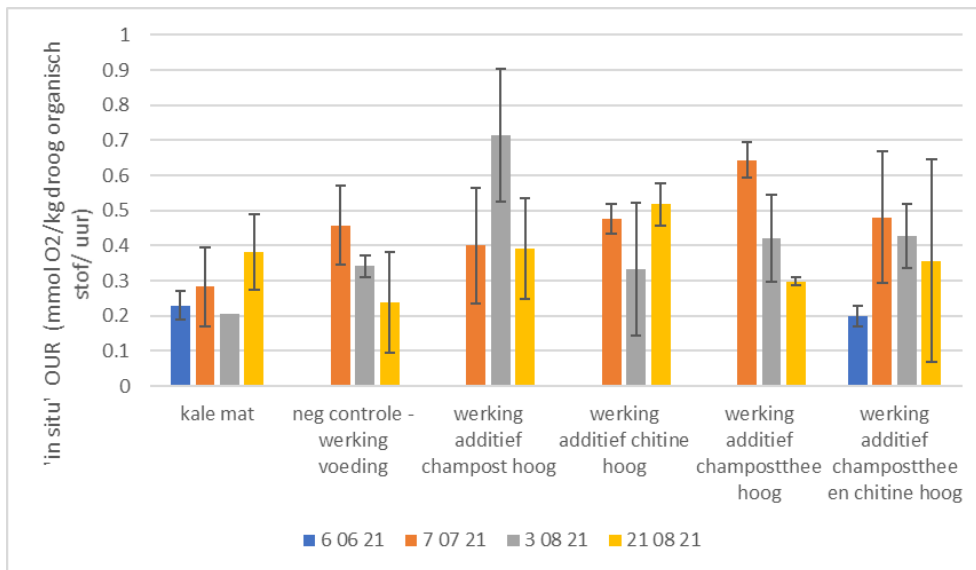
Figuur 3.5 Elementenconcentratie van ijzer, mangaan en borium in droog blad materiaal (umol element/ kg drogestof) aan het einde van de proef. $n=2$. Lijnen geven standaard deviatie aan.

3.2 De microbiële activiteit

3.2.1 Oxygen Uptake Rate (OUR) metingen

De 'in situ' OUR methode gaf aan dat in de matten zonder planten (kale mat) via de voeding bacteriële activiteit gemeten kon worden. Zelfs bij de start van de proef in de schone matten is er een basis waarde van 0.2 mmol zuurstof gebruik. In de OUR-waarden van de matten met planten is dus een (klein) deel afkomstig van deze basis zuurstofconsumptie.

Het is moeilijk om conclusies te trekken op basis van de gemeten OUR: De activiteit op 7 juli 2021 geeft aan dat van alle behandelingen de champost thee de meeste microbiële activiteit liet zien (Figuur 3.6). Echter op 3 augustus 2021 was de hoogste activiteit in de champost met hoge concentratie gemeten.

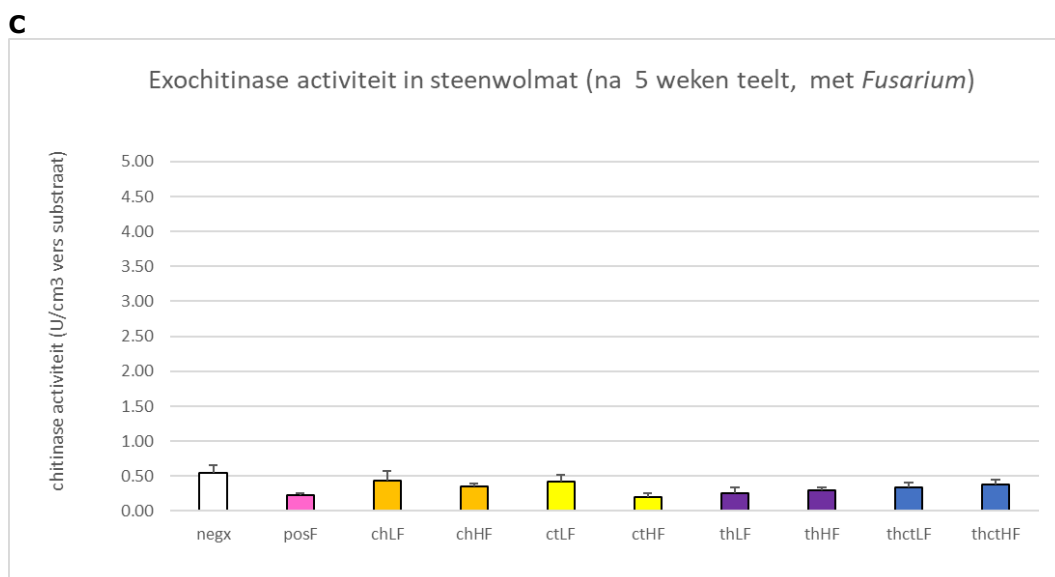
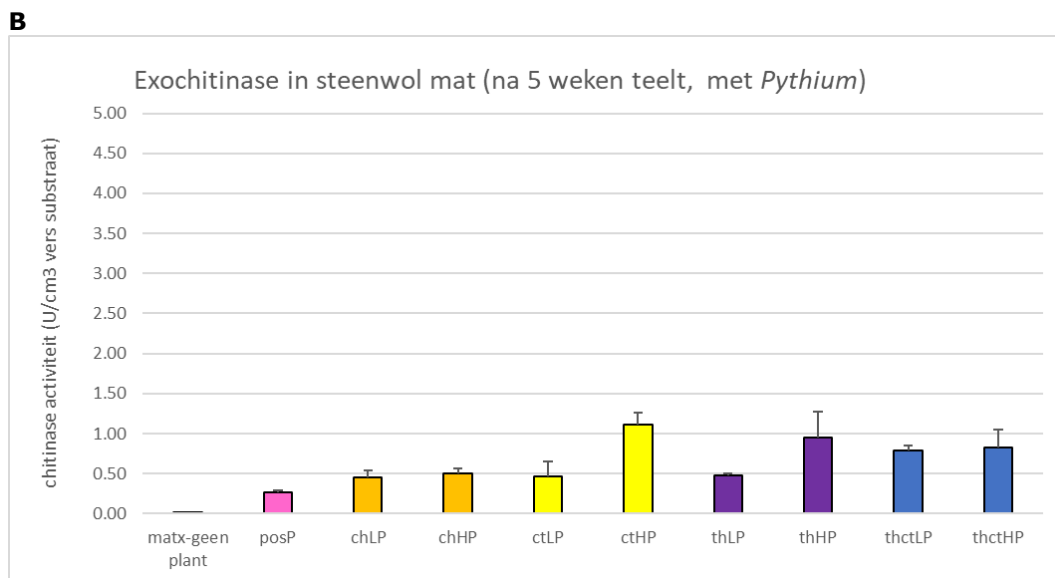
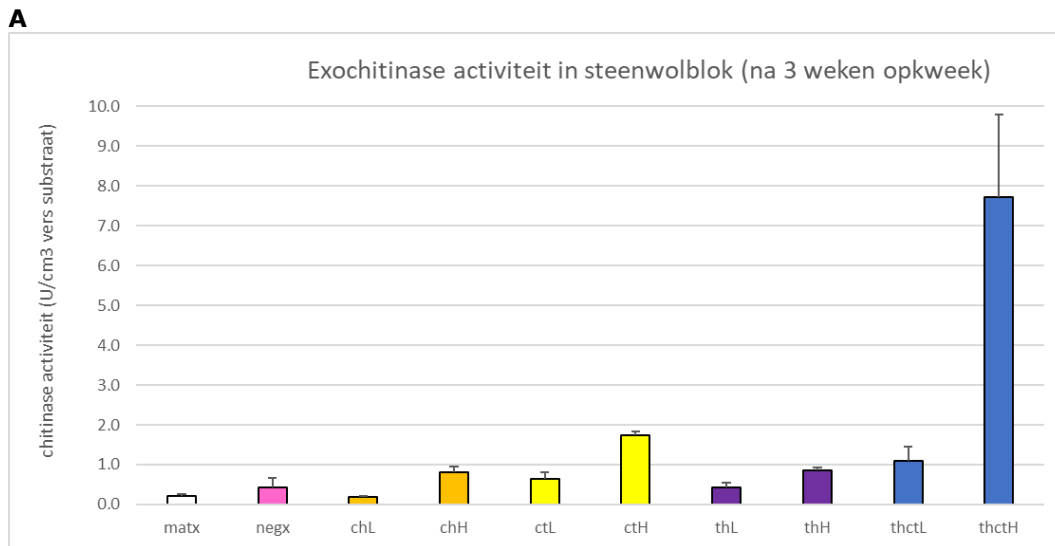


Figuur 3.6 Aangepaste oxygen uptake rate (OUR in mmol O₂/kg droog organisch stof / uur) op vier tijdstippen. Tijdstip 6-06-21 is van ongebruikte matten. n=2. Lijnen geven standaard deviatie aan.

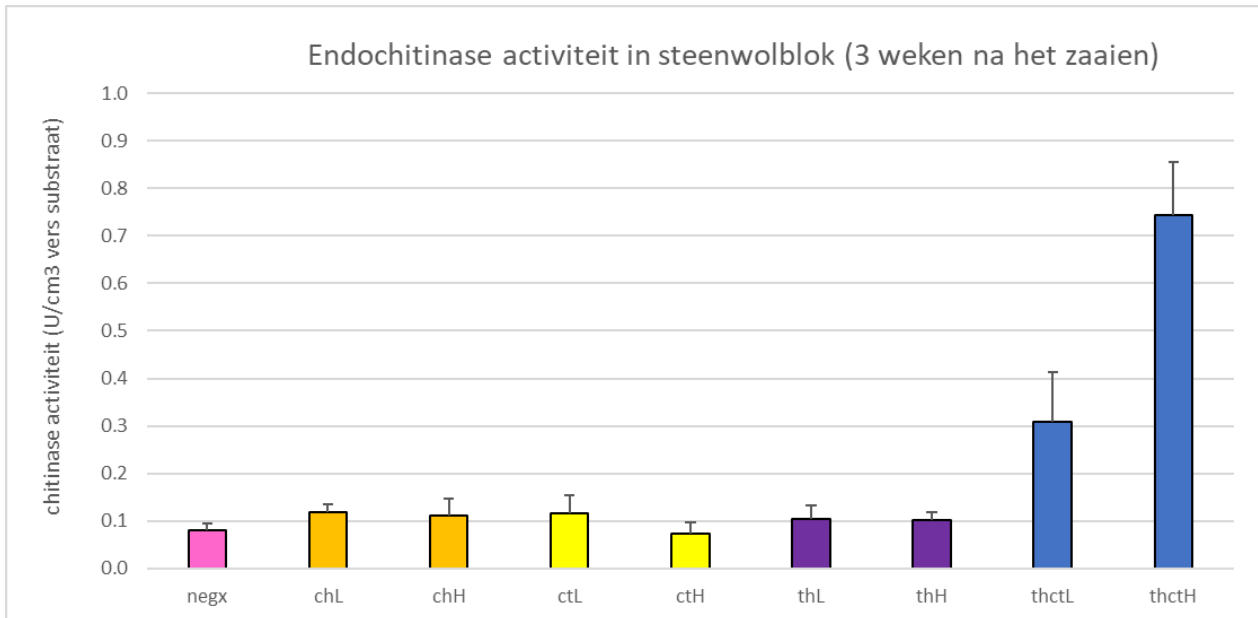
3.2.2 Chitinase activiteit

Endo- en exochitinase activiteit zijn gemeten op twee tijdstippen tijdens de komkommer teelt (na de opkweek periode, meting in steenwolblok) en na 5 weken teelt op de mat (meting in steenwolmat). Exochitinase activiteit was het hoogst in de steenwolblokken na drie weken van komkommer opkweek (Figuur 3.7 A). In steenwolblokken van behandeling met hoge dosis chitine en champostthee is de hoogste potentiële exochitinase activiteit gemeten. Potentiële exochitinase activiteit in de steenwolmatten (na 5 weken teelt en inoculatie van pathogenen) is ongeveer op hetzelfde niveau als activiteit gemeten in steenwolblok, met uitzondering van behandeling met hoge dosis chitine en champostthee met significant lagere waarden gemeten in steenwolmat dan in steenwolblok (Figuur 3.7 B en C).

Potentiële activiteit van endochitinase was relatief laag in steenwolblokken (onder 0.1 U/cm³ steenwol) met uitzondering van steenwolblokken met combinatie behandelingen chitine+ champostthee. Potentiële chitinase activiteit was 0.31 U/cm³ steenwol en 0.74 U/cm³ steenwol respectievelijk voor laag en hoog dosering chitine+ champostthee (Figuur 3.8). Tijdens de teelt bleef de potentiële activiteit van endochitinase in steenwolmatten onder 0.1 U/cm³ steenwol.



Figuur 3.7 Exochitinase activiteit in steenwolmatten tijdens teelt van komkommer: A) in de steenwolblok (na 3 weken opkweek); B) in de mat na 5 weken teelt (*Pythium* inoculatie) en C) in de mat na 5 weken teelt (*Fusarium* inoculatie). De code vermeldt toeslagstof (ch=champost; ct=chitine; th=champostthee), toedieningsniveau (L of H) en besmetting (P, F of x, waarbij x geen besmetting is).



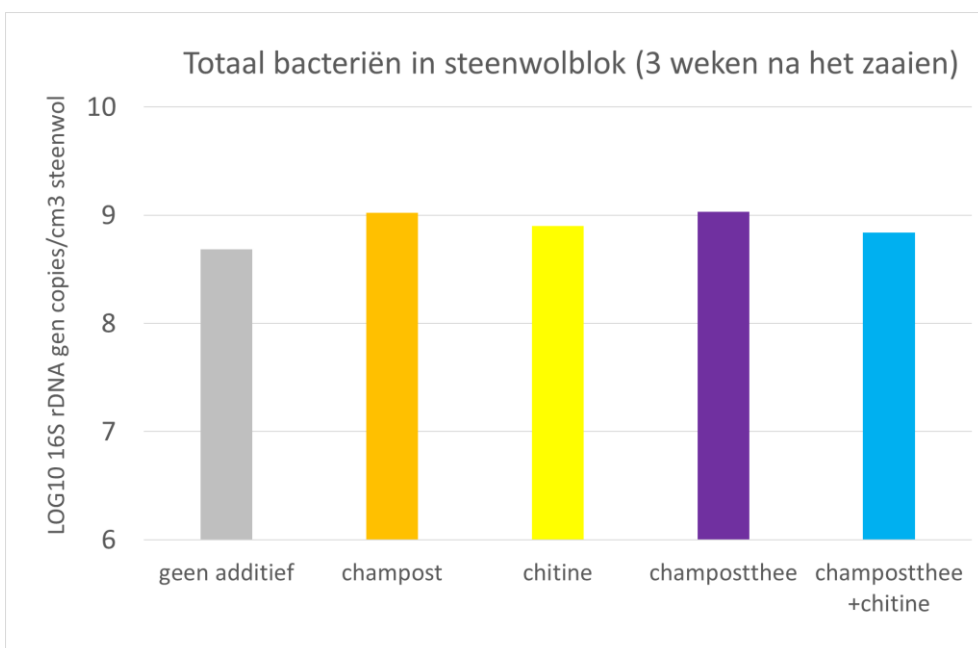
Figuur 3.8 Endochitinase activiteit in steenwolblokken na 3 weken opkweek van komkommer. De code vermeldt toeslagstof (ch=champost; ct=chitine; th=champostthee), toedieningsniveau (L of H).

3.3 qPCR analyses

3.3.1 Aantallen van bacteriën (16S rDNA gen)

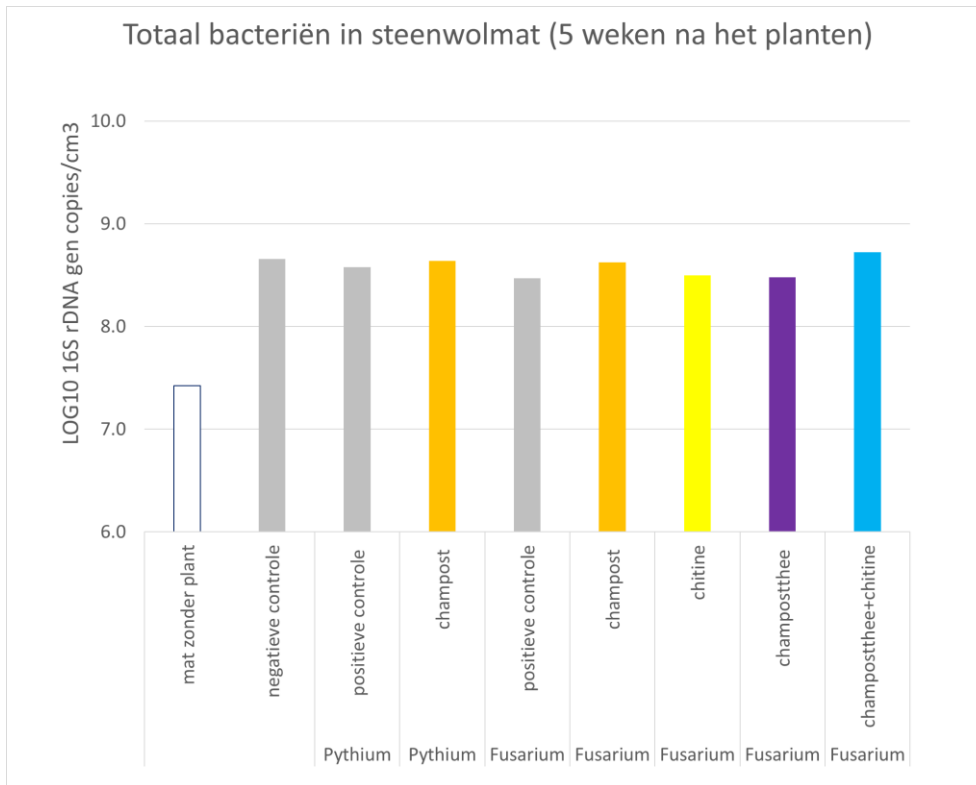
Uit qPCR blijkt dat steenwol snel gekoloniseerd wordt door bacteriën. Al drie weken na het zaaien van komkommer was de hoeveelheid bacteriën al boven 10^8 (LOG10>8), gemeten als kopieën van 16S rDNA gen/cm³ groeimedium, en in alle behandelingen (Figuur 3.9).

Ook de steenwolmatten worden snel gekoloniseerd door bacteriën tijdens teelt van komkommer. Vijf weken van het planten van de komkommers op steenwolmatten, zijn er de hoeveelheden bacteriën boven 10^8 (LOG10>8) kopieën van 16S rDNA gen/cm³ steenwol gemeten (Figuur 3.10).



Figuur 3.9 Totaal aantal bacteriën in steenwolblokken na 3 weken opkweek van komkommer.

Bacteriën waren ook aanwezig in steenwolmatten zonder planten, maar volgedruppeld met voedingswater. Gemeten concentraties waren tussen 10^6 en 10^7 kopieën van 16S rDNA gen/cm³ steenwol, oftewel LOG10 van 6 of 7 (Figuur 3.10).



Figuur 3.10 Totaal aantal bacteriën in steenwolmatten na 5 weken teelt van komkommer.

3.3.2 Aantallen van ammoniak-oxiderende bacteriën (eng. AOB)

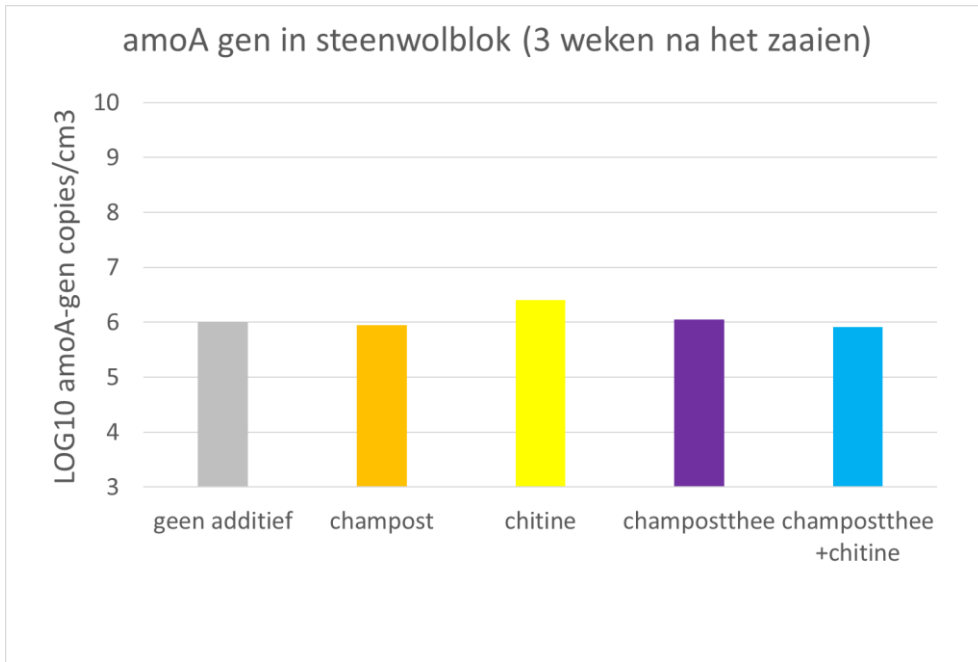
Aantallen van AOB, als aantal kopieën van amoA gen/cm³ groeimedium, waren rond 10^6 kopieën van amoA gen/cm³ steenwolblok na drie weken komkommer opkweek (Figuur 3.11) en tussen 10^3 en 10^5 kopieën van amoA gen/cm³ steenwolmat na vijf weken teelt in de kas (Figuur 3.12).

Er was geen significant effect van de verschillende toevoegingen (champost, chitine of champostthee) op de aanwezigheid van ammoniak oxiderende bacteriën in steenwolmat.

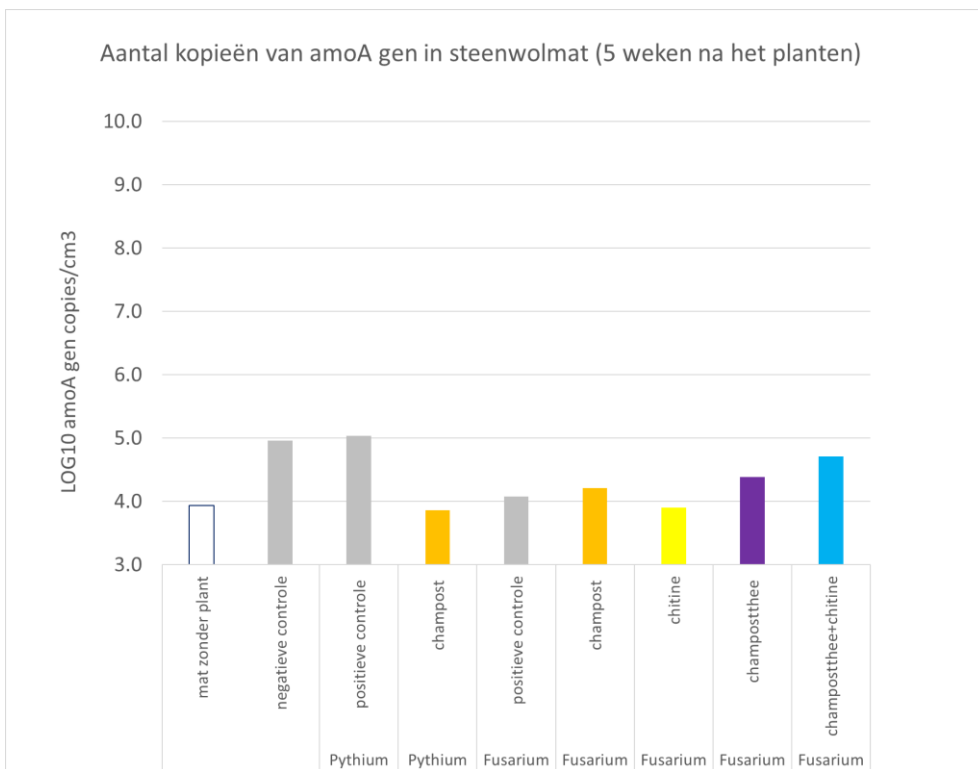
3.3.3 Aantallen van bacteriën met aiiA lactonase

Bacteriën kunnen verschillende lactonase enzymen produceren. Bijvoorbeeld bacteriën van *Bacilli* klasse kunnen lactonase aiiA produceren. Lactonase enzymen spelen een belangrijke rol in afbraak van signaalstoffen (acyl homoserine lactones- AHL's), die sommige gramnegatieve bacteriën gebruiken in communicatie tussen afzonderlijke cellen (zogenaamd quorum sensing). Veel van plantpathogene bacteriën zijn gramnegatief, o.a. *Rhizobium rhizogenes* (overmatige wortelgroei), *Agrobacterium tumefaciens*, *Acidovorax*, *Erwinia* en *Pectobacterium*. Lactonases, zoals aiiA lactonase, breken de AHL signaalstoffen af en daardoor kunnen ze de communicatie tussen plantpathogene bacteriën beïnvloeden en mogelijk infectie van de plant vertragen/voorkomen.

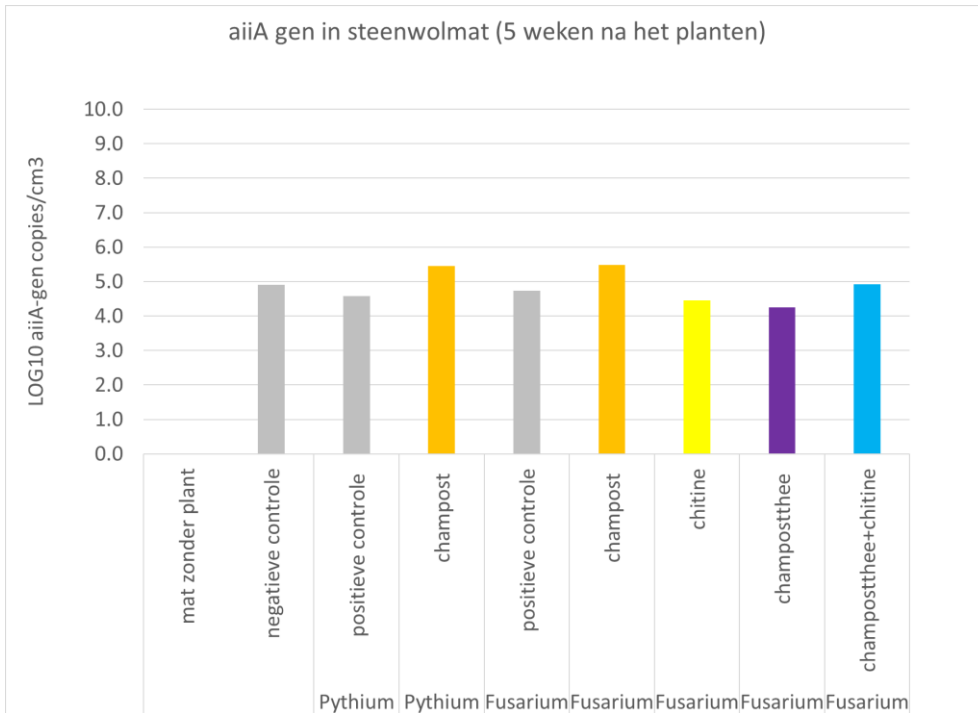
Bacteriën, die aiiA lactonase gen hebben, waren niet aanwezig in steenwolblokken na drie weken opkweek van komkommer. Wel waren ze aanwezig in de steenwolmatten na vijf weken van komkommerteelt (Figuur 3.13). Alleen in de matten zonder planten waren er geen kopieën van aiiA gen gevonden.



Figuur 3.11 Aantal kopieën van bacteriële amoA gen in steenwolblokken na 3 weken opkweek van komkommer.



Figuur 3.12 Aantal kopieën van bacteriële amoA gen in steenwolmatten na 5 weken teelt van komkommer.



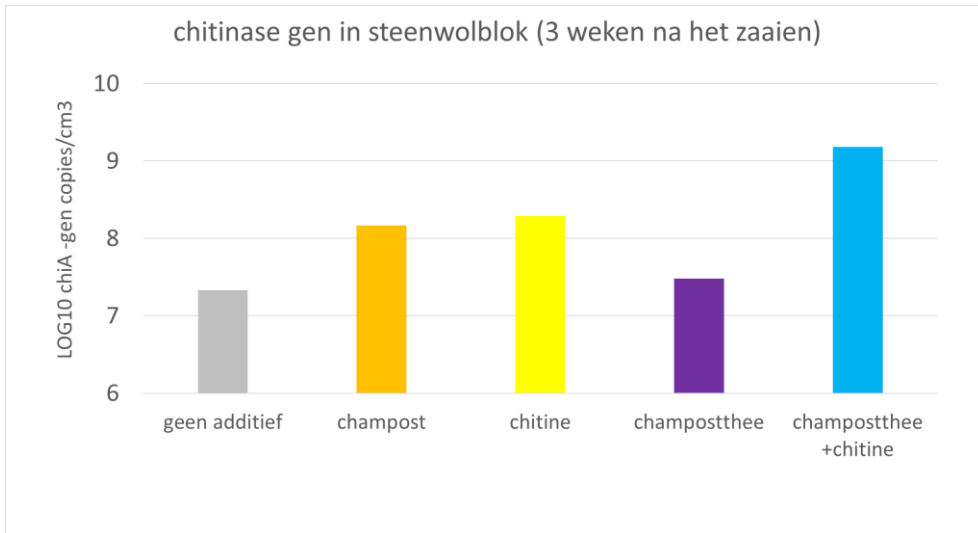
Figuur 3.13 Aantal kopieën van bacteriële aiiA gen in steenwolmatten na 5 weken teelt van komkommer.

3.3.4 Aantallen van bacteriën met chitinase (chiA) gen

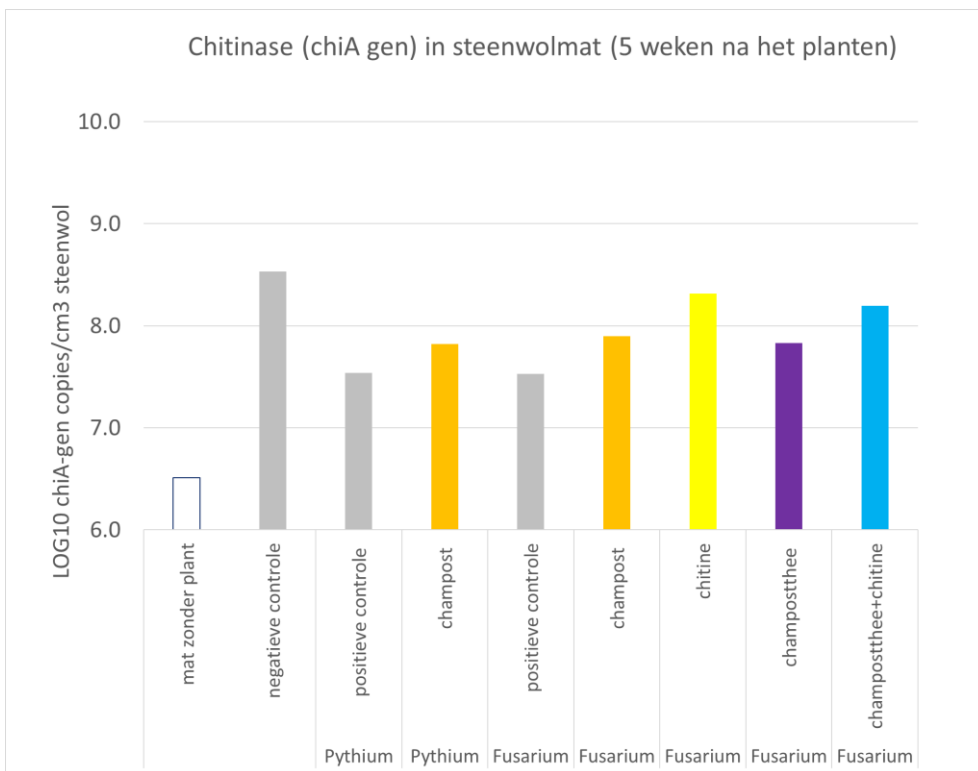
Bacteriën, die chitinases produceren, o.a. chiA, zijn belangrijk voor de afbraak van dode schimmelbiomassa zodat de voedingsstoffen, die erin zitten, terug in het ecosysteem komen. Er worden verschillende chitinases geproduceerd door micro-organismen. In dit onderzoek is aanwezigheid van één chitinase A (chiA gen) gemeten.

Gemiddelde aantal kopieën van chiA gen/cm³ steenwolblokken na drie weken opkweek tomaat waren significant beïnvloedt door toevoeging van champost en chitine (Figuur 3.14), met concentraties van 10⁸ en 10⁹ kopieën van chiA gen/cm³ steenwolblok, terwijl hoeveelheid van kopieën van chiaA gen in controle steenwolblokken, zonder toevoegingen, was 10⁷ kopieën van chiA gen/cm³ steenwolblok. Toevoeging van champostthee had geen significant effect op aanwezigheid van chiA gen in steenwolblok gedurende opkweek van komkommer

Veel kopieën van chiA gen waren ook aanwezig in de monsters van steenwolmat die zijn genomen na vijf weken teelt van komkommer (Figuur 3.15). Hoeveelheden van chiA gen kopieën in steenwolmatten zonder plant waren significant lager dan in steenwolmatten waarop komkommerplanten groeiden, net zoals in het geval van 16S rDNA gen, amoA gen en aiiA gen.



Figuur 3.14 Aantal kopieën van *chiA* gen in steenwolblokken na 3 weken opweek van komkommer.

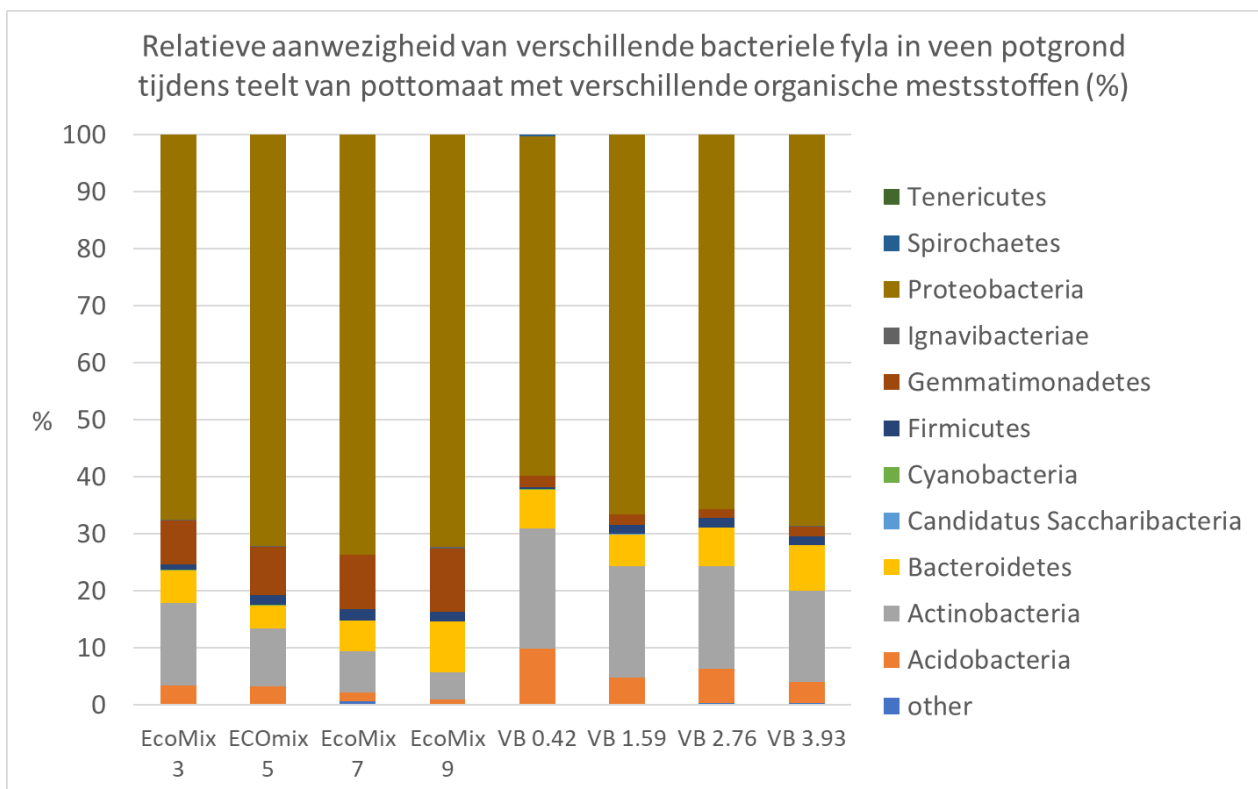


Figuur 3.15 Aantal kopieën van *chiA* gen in steenwolmatten na 5 weken teelt van komkommer.

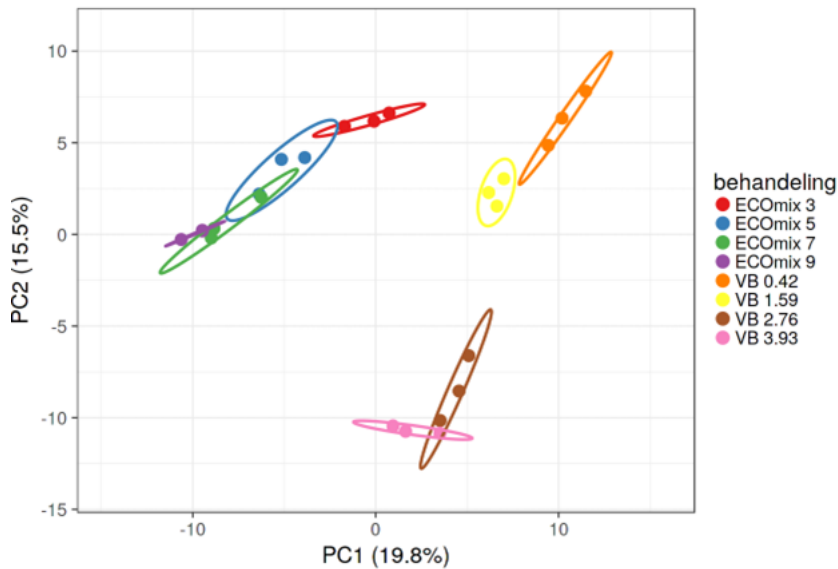
3.4 Samenstelling van bacteriële microbiom in groeimedia (metabarcoding analyse)

3.4.1 Bacteriële en schimmel microbiom van veen potgrond tijdens de teelt van pottomaat met organische meststoffen

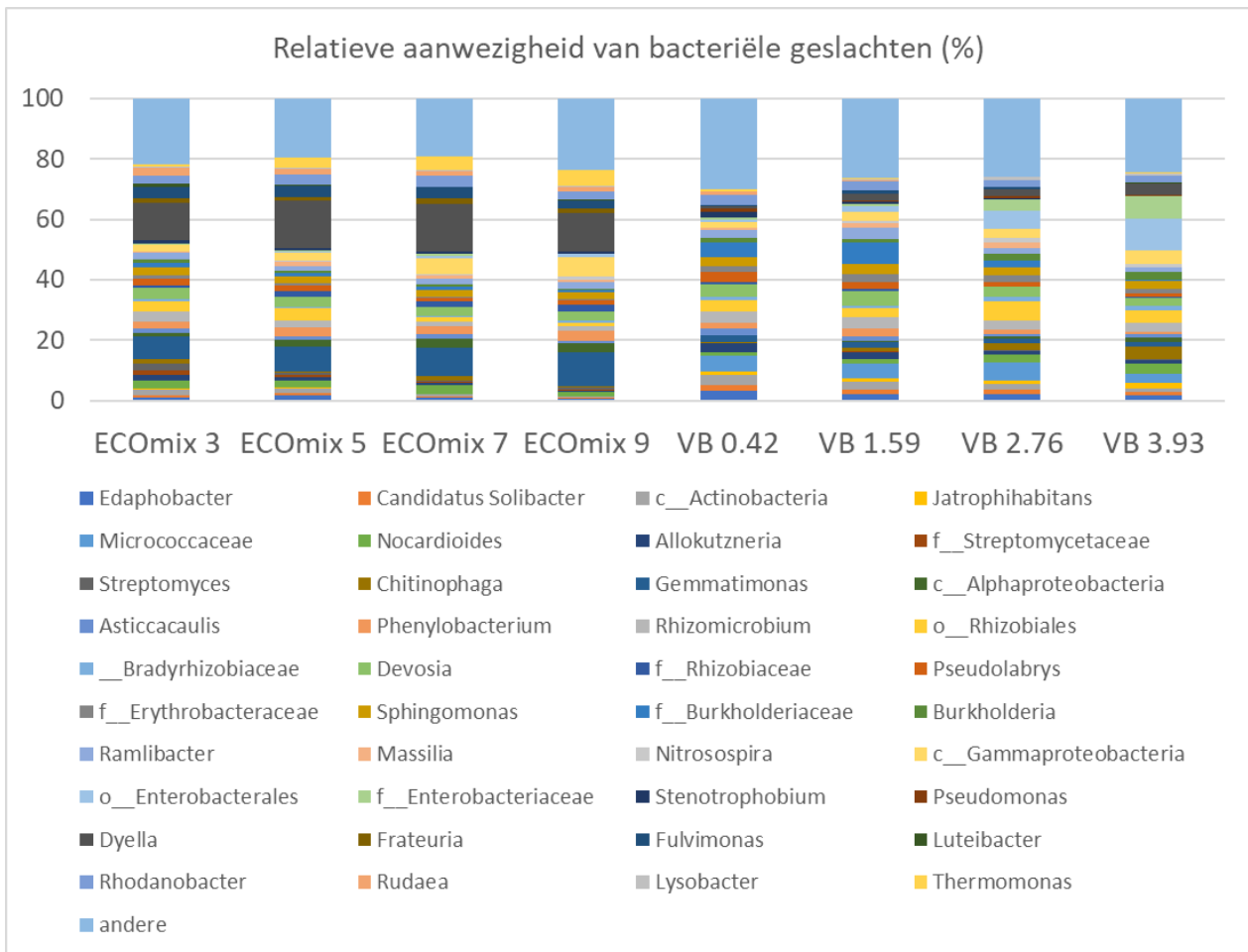
In deze proef is effect van twee typen organische meststoffen op groei van pottomaat vergeleken. Twee organische meststoffen waren gebruikt in de proef: 1) een vaste organische meststof (EcoMIX 4.0) en 2) vloeibare organische meststof (Viscotec Blue) in 4 verschillende doseringen (zie eerdere rapportage in De Visser et al, 2021). Samenstelling van bacteriële microbiom in de veen potgrond is gemeten aan het eind van de teeltproef. Bacteriële microbiom van de potgrond is significant beïnvloedt door de toepassing van de verschillende organische meststoffen. Het gebruik van de vaste organische meststof resulteerde in hogere relatieve aanwezigheid van *Proteobacteria (Pseudomonadota)* en *Gemmatimonadetes* in de potgrond in vergelijking met potgrond die gefertigeerd was met vloeibare organische meststof (Figuur 3.16). Terwijl het aandeel van *Actinobacteria* en *Acidobacteria* juist lager was in de potgrond met vaste organische meststof dan in de potgrond met vloeibare organische meststof. De samenstelling van het totale bacteriële microbiom in de monsters van potgrond met toevoeging van vaste organische meststof was ook significant verschillend van het bacteriële microbiom in de potgrond met vloeibare organische meststof (Figuur 3.17).



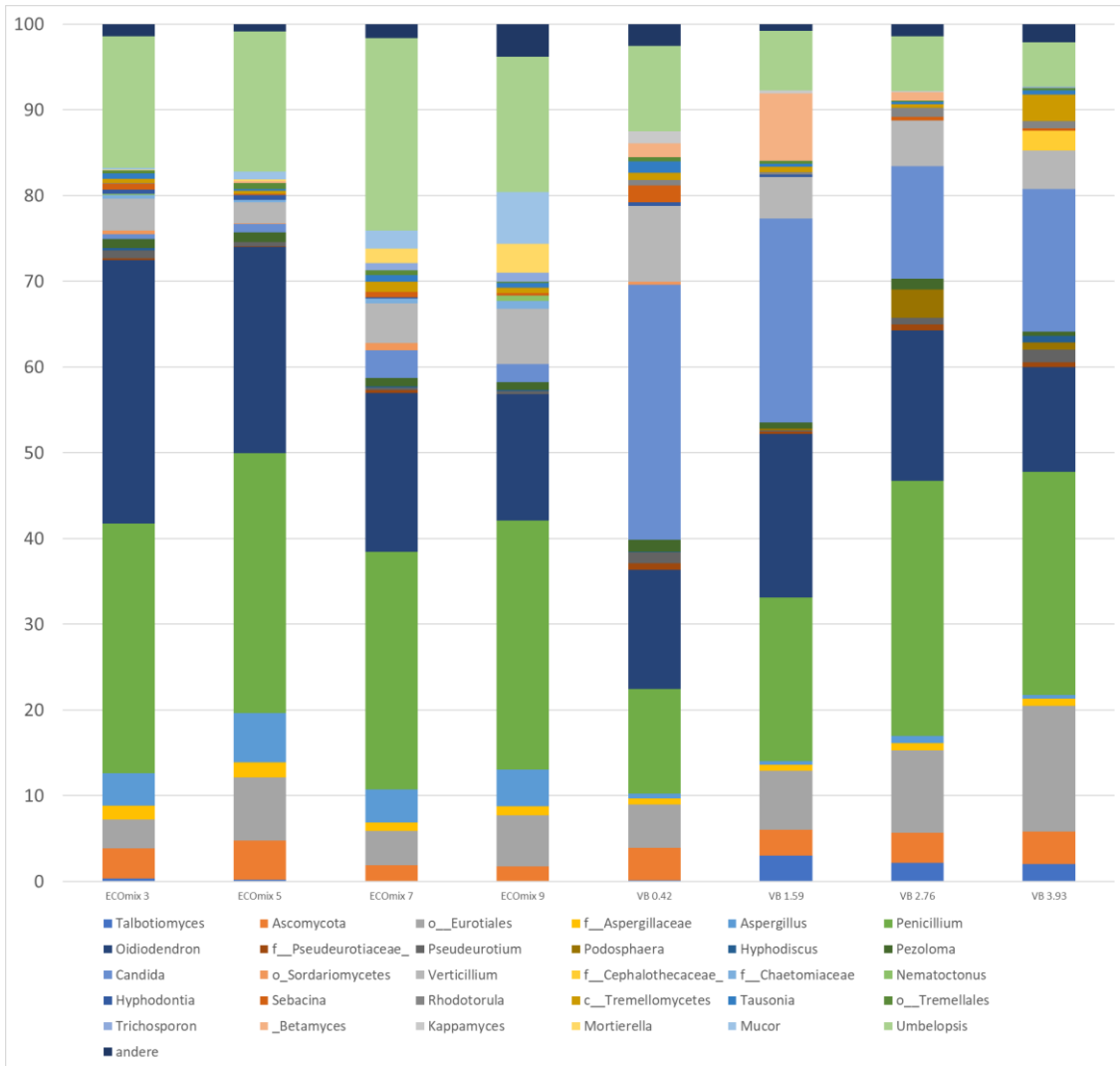
Figuur 3.16 Relatieve aanwezigheid van verschillende bacteriële fyla in de monsters van veen potgrond tijdens teelt van pottomaat met twee verschillende organische meststoffen: EcoMIX- EcoMIX 4.0 in concentraties 3, 5, 7 of 9 g N/L groeimedium of VB- Viscotec Blue concentraties 0.42, 1.59, 2.76 of 3.93 g N/L groeimedium.



Figuur 3.17 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële microbiomen (geslacht niveau) in potgrond met toevoeging van verschillende organische meststoffen. EcoMIX- EcoMix 4.0 in concentraties 3, 5, 7 of 9 g N/L groeimedium of VB- Viscotec Blue concentraties 0.42, 1.59, 2.76 of 3.93 g N/L groeimedium.



Figuur 3.18 Relatieve aanwezigheid van verschillende bacteriële geslachten (met relatieve aanwezigheid van >1% in tenminste 1 monster) in de monsters van veen potgrond tijdens teelt van pottomaat met twee verschillende organische meststoffen: EcoMIX- EcoMix 4.0 in concentraties 3, 5, 7 of 9 g N/L groeimedium of VB- Viscotec Blue concentraties 0.42, 1.59, 2.76 of 3.93 g N/L groeimedium.



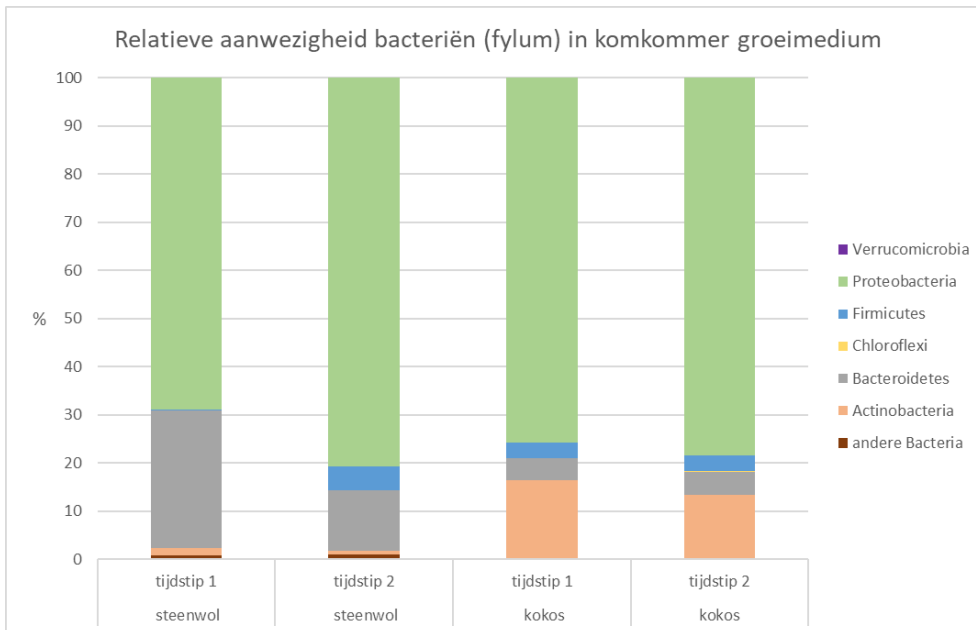
Figuur 3.19 Relatieve aanwezigheid (%) van verschillende schimmel geslachten in de monsters van veen potgrond tijdens teelt van pottomaat met twee verschillende organische meststoffen: EcoMix- EcoMix 4.0 in concentraties 3, 5, 7 of 9 g N/L groeimedium of VB- Viscotec Blue concentraties 0.42, 1.59, 2.76 of 3.93 g N/L groeimedium.

Schimmel microbiom in veen potgrond werd gedomineerd door een klein aantal schimmel geslachten, zoals *Aspergillus*, *Penicillium*, *Oidiodendron*, *Mortierella*, *Candida* en *Umbelopsis*. (Figuur 3.18). Type van organische meststof had vooral invloed op relatieve aanwezigheid van deze verschillende geslachten, maar gebruik van vloeibare vs vaste meststof resulteerde niet in ontwikkeling van schimmelpopulatie met heel andere taxonomisch identiteit (Figuur 3.19).

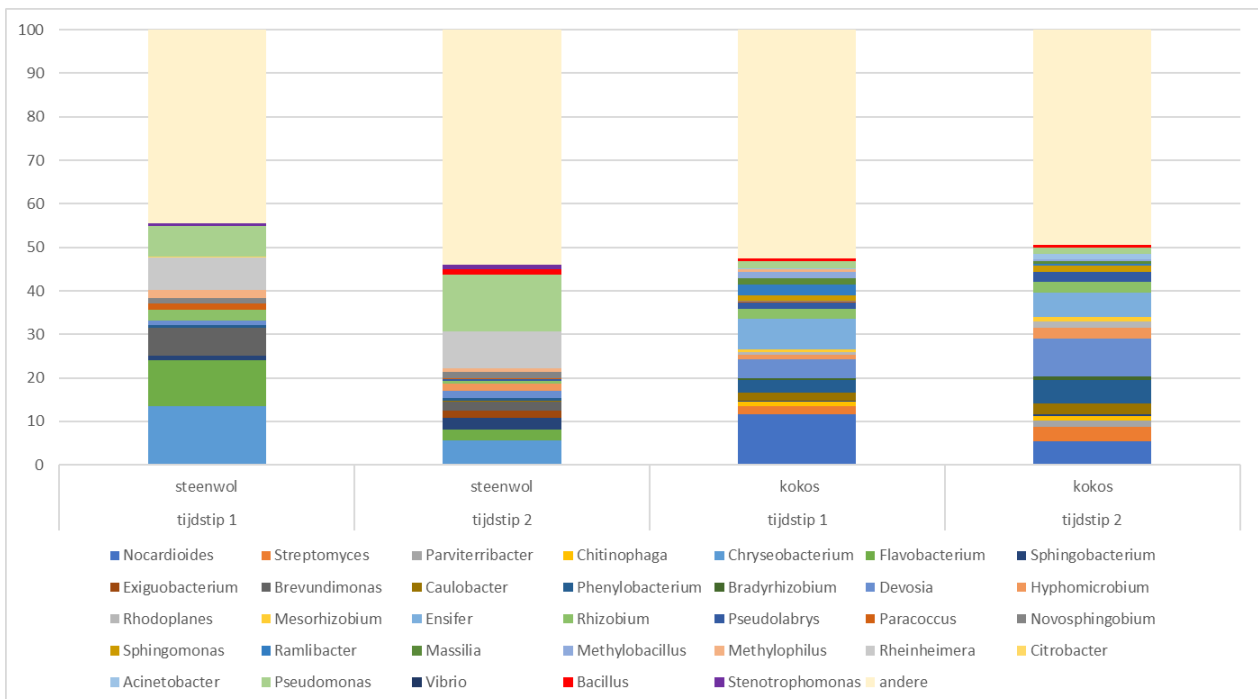
3.4.2 Microbiom van steenwol en kokos groeimedia tijdens teelt van de komkommer (proef 2020)

Verschiede bacteriën ontwikkelden zich in de steenwol en kokosmatten tijdens de teelt van komkommer. Daarom verschillen de bacteriële microbiomen van steenwol en kokos groeimedia significant van elkaar (Figuur 3.20 en Figuur 3.21). *Proteobacteria* fyllum was dominant, zowel in steenwol als in kokos groeimedium (tussen 70% en 80% van de relatieve aanwezigheid). Opmerkelijk is dat in steenwol en kokos zich andere geslachten hebben gevestigd, beiden wel van het fyllum *Proteobacteria*. Bijvoorbeeld, in steenwol was er veel *Pseudomonas* aanwezig (tot 13% van relatieve aanwezigheid, Figuur 3.21), terwijl deze in kokos in veel mindere mate aanwezig was. In steenwol zijn ook weinig *Actinobacteria* gevonden en in kokos groeimedium juist veel (tussen 10 en 20% van relatieve aanwezigheid). Dit is te verwachten omdat kokos meer complexe organische verbindingen bevat, die als voedsel dienen voor *Actinobacteria*.

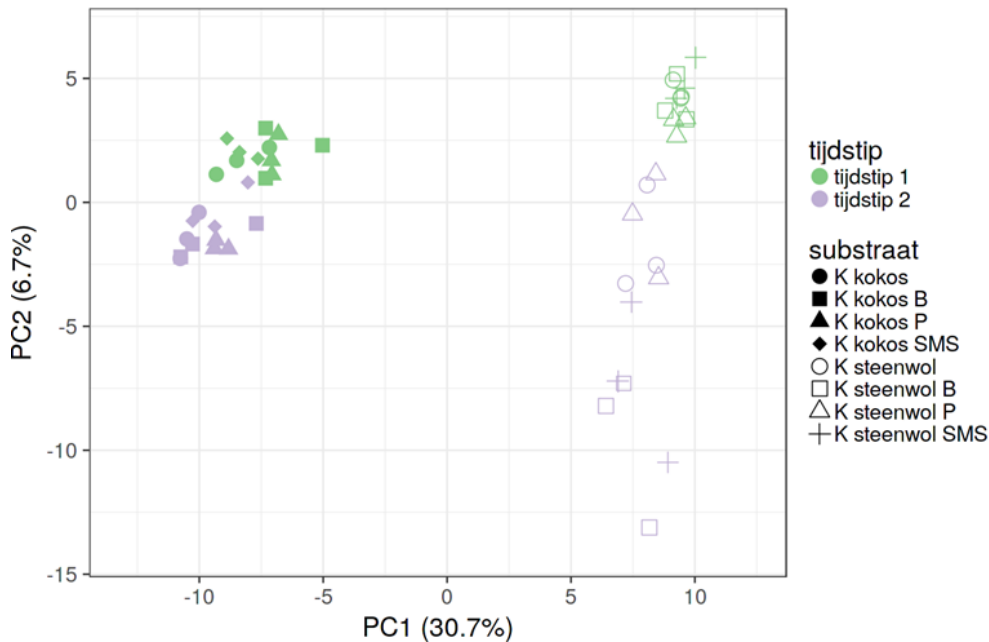
In steenwol groeimedium zijn er veel bacteriën van fyllum *Bacteroidetes* gevonden. Sommige van deze bacteriën, zoals *Flavobacterium* (tot 10.5% van relatieve aanwezigheid in steenwol; Figuur 3.21), kunnen een actieve rol spelen in onderdrukking van de wortelpathogenen.



Figuur 3.20 Relatieve aanwezigheid van verschillende bacteriële fyla in de monsters van steenwol en kokos groeimedia op twee tijdstippen in de komkommer teelt.



Figuur 3.21 Relatieve aanwezigheid (%) van verschillende bacteriële geslachten (met relatieve aanwezigheid >1%) in de monsters van controle behandeling op steenwol en kokos groeimedia op twee tijdstippen in de teelt (tijdstip 1: 2 weken na planten; tijdstip 2: 5 weken na planten).

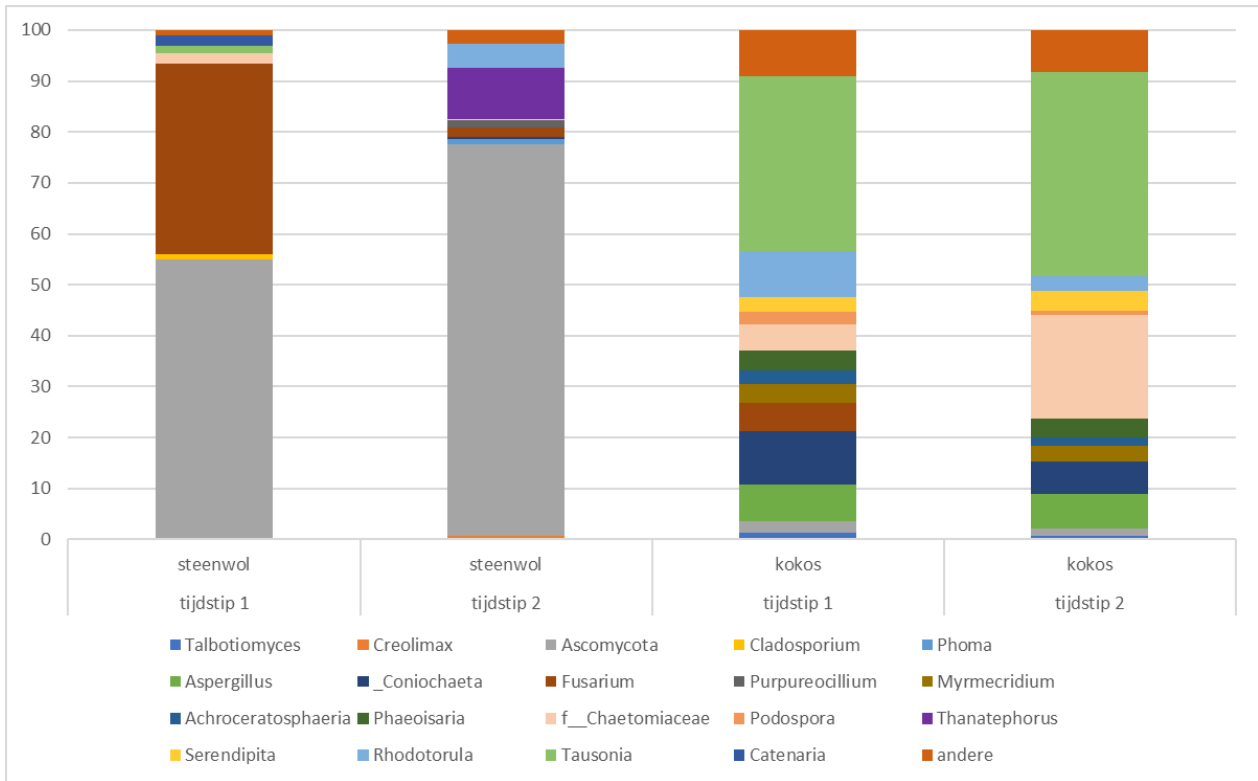


Figuur 3.22 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële microbiomen (geslacht niveau) in steenwol en kokos groeimedia tijdens de teelt van komkommer (B- biochar; SMS- champost; P- *Pythium* inoculatie).

Tijdstip van de bemonstering heeft ook duidelijk effect op samenstelling van het bacteriële microbiom van groeimedia (Figuur 3.21). Waarschijnlijk zijn de wortellexudaten een belangrijke factor die de samenstelling van het microbiom beïnvloeden (verschillen in hoeveelheid en kwaliteit van wortellexudaten afhankelijk van de fase in plantgroei).

De in deze proef gebruikte toeslagstoffen, biochar (B) en champost (SMS), hadden geen significant effect op de samenstelling van het bacteriële microbiom in kokosmatten. In steenwolmatten is verschil in samenstelling van bacteriële microbiom te zien, tussen onbehandelde steenwolmatten en matten met toevoegingen van biochar of champost, tijdens de tweede bemonstering, later in de teelt (tijdstip 2 in Figuur 3.22). Beide toeslagstoffen, biochar en champost, zijn niet vermengd met groeimedium, maar gelegd op het plantgat. Het is waarschijnlijk dat het effect van toeslagstoffen nog niet goed zichtbaar was in kokos omdat de organische moleculen afkomstig van toeslagstoffen nog niet goed verspreid waren in de hele mat. Biochar en champost bevatten daarnaast veel delen die niet goed wateroplosbaar en mobiel zijn.

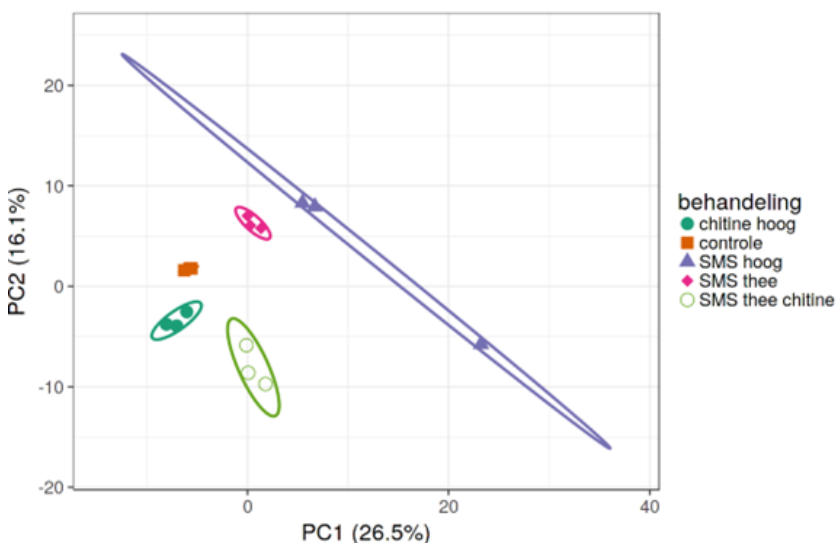
Er was ook verschil in schimmelpopulaties tussen steenwol en kokos groeimedia tijdens de teelt van komkommer. Microbiom van steenwol werd gedomineerd door bacteriën en het was ook niet mogelijk om alle in steenwol aanwezige schimmels te identificeren verder dan fylum (stam) niveau van Ascomycota (Figuur 3.23). Diversiteit van de schimmels was groter in kokos dan in steenwol, alhoewel ook in kokos relatief kleine groep van geslachten verantwoordelijk is voor meer dan 90% van alle gevonden sequenties. Toevoeging van biochar of champost had geen significant effect op diversiteit van schimmelpopulaties in steenwol en kokos groeimedia.



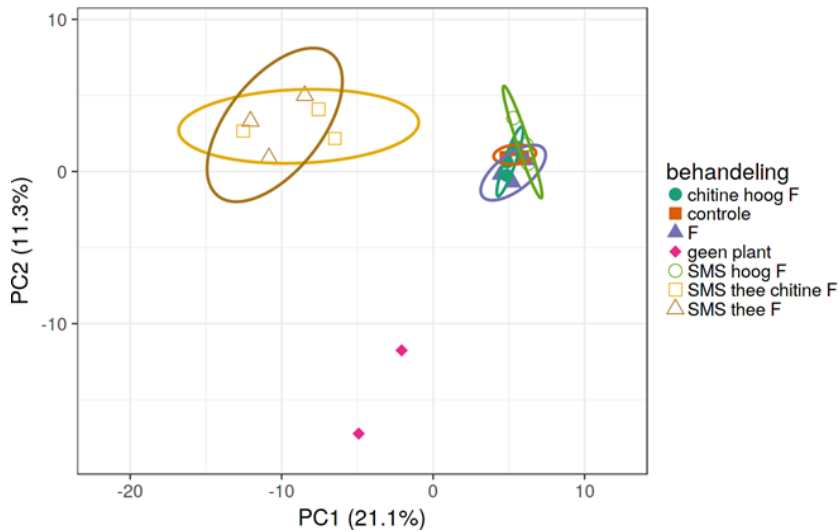
Figuur 3.23 Relatieve aanwezigheid (%) van verschillende schimmel geslachten in de monsters van steenwol en kokos groeimedium op twee tijdstippen in de teelt (tijdstip1 = 2 weken na planten; tijdstip2 = 5 weken na planten).

3.4.3 Microbioom van steenwol groeimedia tijdens teelt van de komkommer (proef 2021)

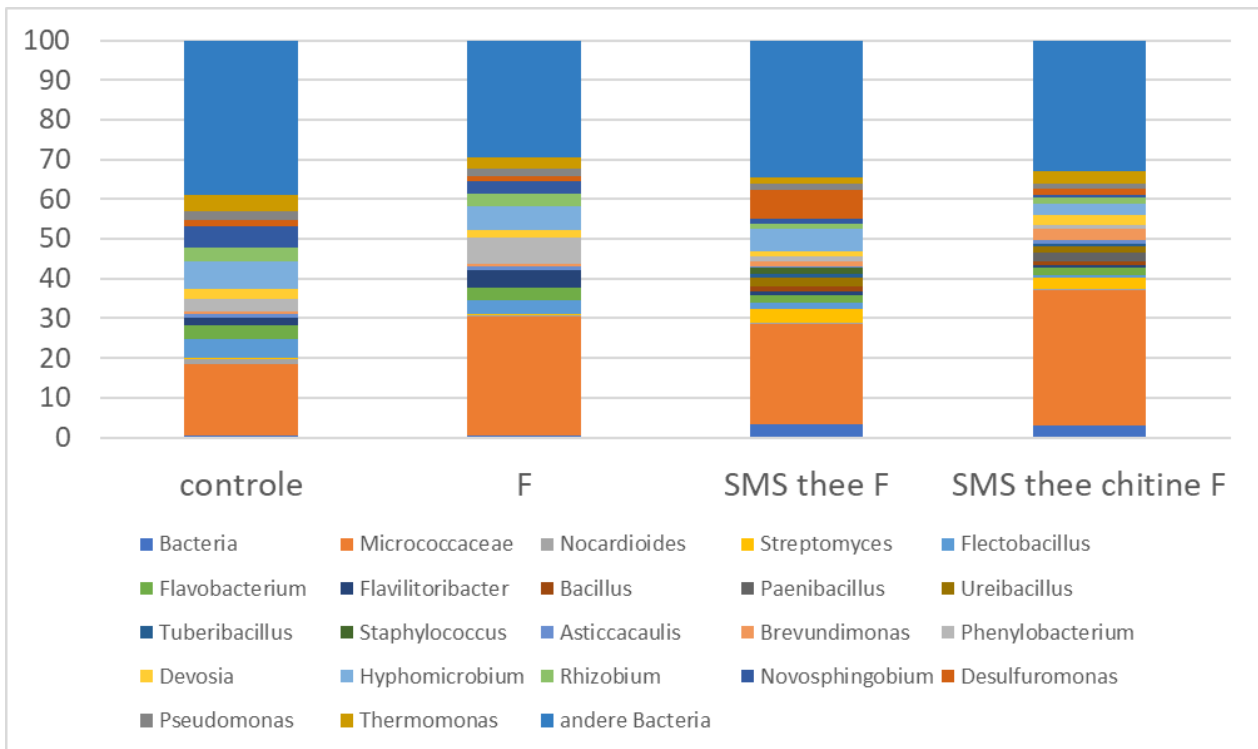
Steenwol microbioom tijdens opkweek en teelt van de komkommer was te beïnvloeden met toevoeging van champost, chitine en champostthee. Al na 3 weken opkweek was het effect van de toevoegingen op de samenstelling van bacteriële microbioom zichtbaar (Figuur 3.24). In de steenwolmatten na 2 weken komkommer teelt was alleen significant effect zichtbaar in behandeling met champostthee of combinatie champostthee en chitine. Ook het bacteriële microbioom van de steenwolmatten zonder planten was significant anders dan in de steenwolmatten met planten daarop (Figuur 3.25).



Figuur 3.24 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële microbiomen (geslacht niveau) in steenwolblokken na drie weken van komkommer opkweek (SMS- champost; SMS thee- champostthee).



Figuur 3.25 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële microbiomen (geslacht niveau) in steenwolmatten na twee weken teelt van komkommer (SMS- champost; SMS thee- champostthee; F- na inoculatie met *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*).



Figuur 3.26 Relatieve aanwezigheid (%) van verschillende bacteriële geslachten (met relatieve aanwezigheid >1%) in de monsters van steenwol groeimedia twee weken na het planten van de komkommers op de mat (SMS thee- champostthee; chitine toevoeging; F- na inoculatie met *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*).

3.5 Ziekteontwikkeling

3.5.1 Kasproef

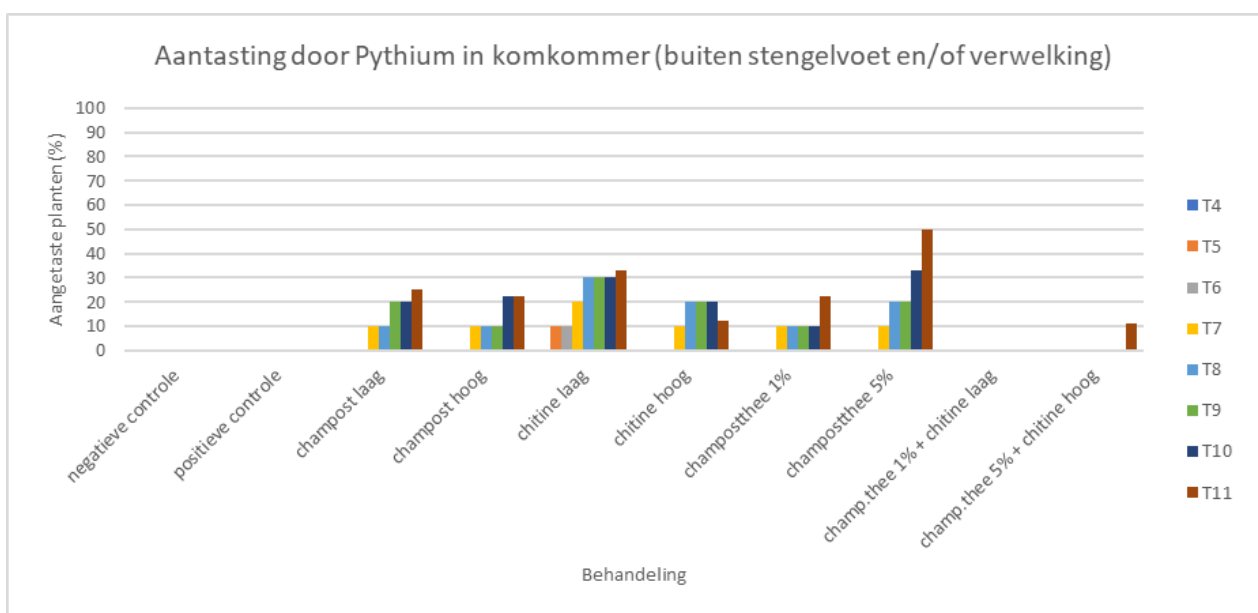
Drie weken na het zaaien zijn komkommers in de kasproef geïnoculeerd met *Pythium aphanidermatum* of *Fusarium oxysporum radialis-cucumerinum*. De eerste zichtbare symptomen van de infectie zijn ongeveer vier weken later waargenomen. De infectie begon met aantasting van de stengelvoet (Figuur 3.27).



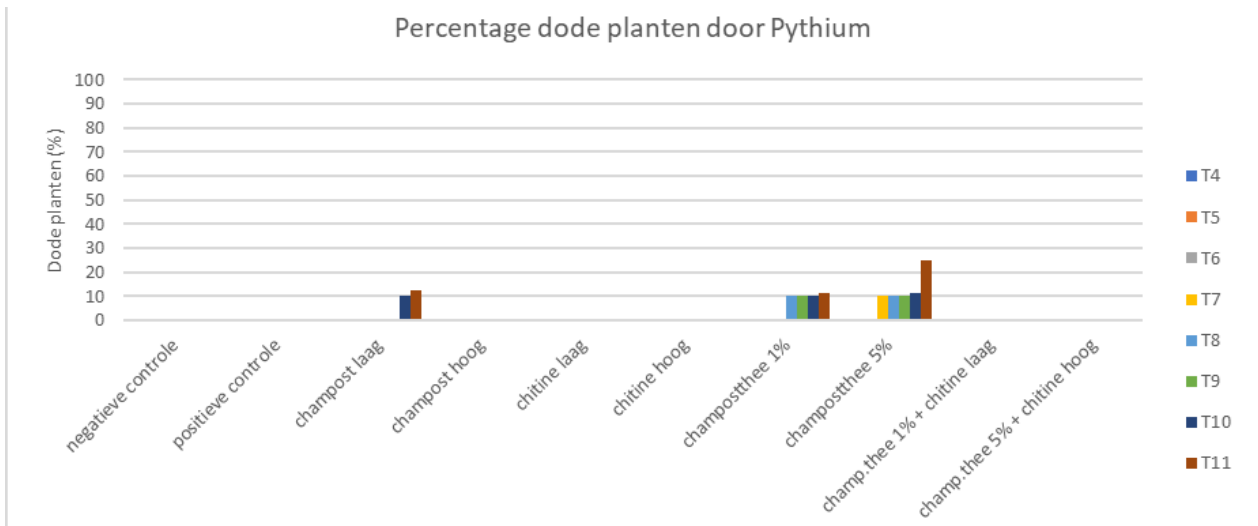
Figuur 3.27 Waargenomen *Fusarium* aantasting van de stengelvoet bij komkommer.

3.5.2 Ziekteontwikkeling door Pythium

De ziekte ontwikkelde zich matig. Aantasting aan de buitenkant van de stengel en vergeling en verwelking zijn gedurende de proef bij een klein aantal planten van verschillende behandelingen waargenomen en was niet ernstig (Figuur 3.28). Enkele planten zijn door ziekte dood gegaan (Figuur 3.29). Bij de positieve controle is bij geen enkele plant vergeling, verwelking en/of aantasting aan de buitenkant van de stengel waargenomen (Figuur 3.28, 3.29).

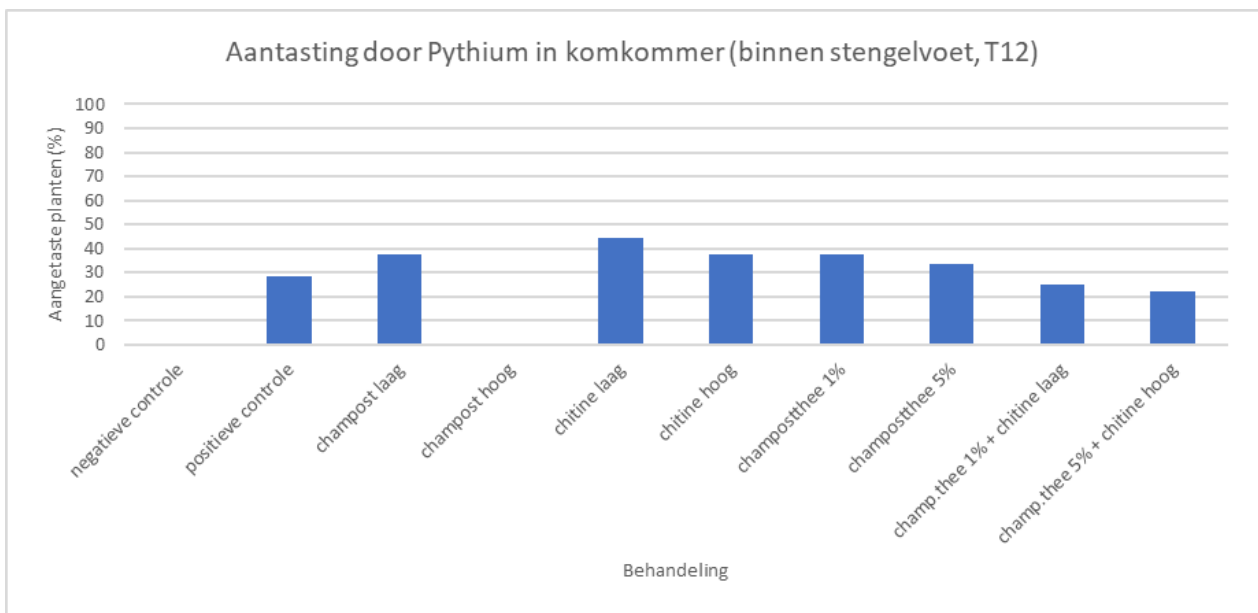


Figuur 3.28 Ontwikkeling van aantasting door *Pythium* aan de buitenkant van de stengelvoet en/of verwelking/vergelting van komkommerplanten in verschillende behandelingen over de tijd.

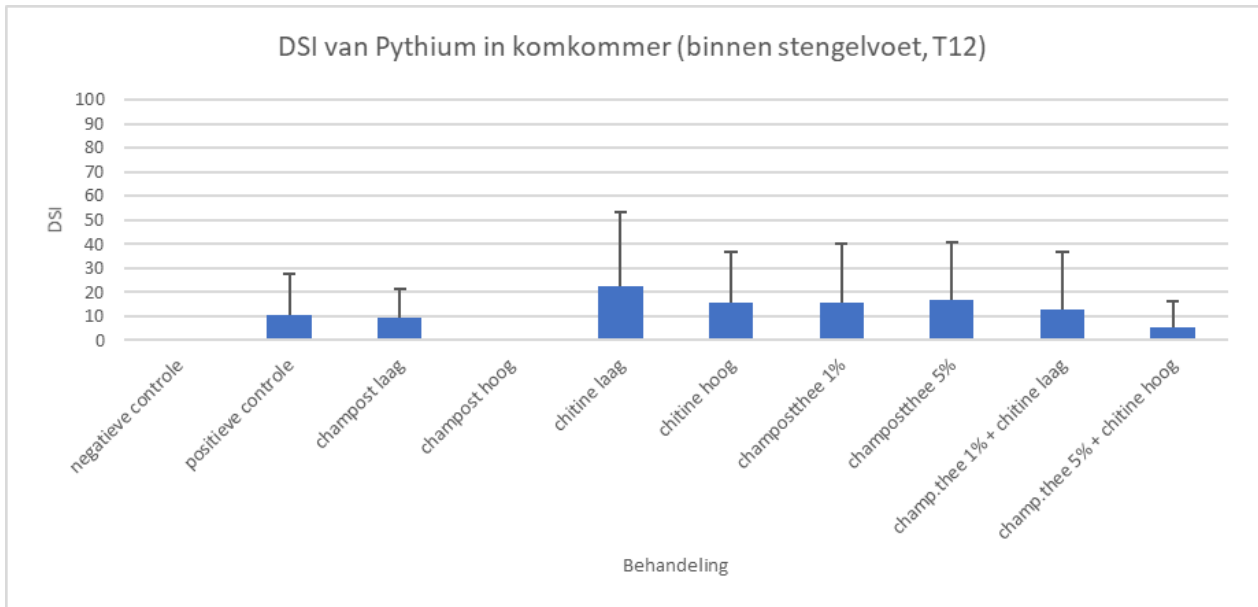


Figuur 3.29 Percentage dode komkommerplanten, veroorzaakt door *Pythium*, in verschillende behandelingen over de tijd.

Bij de eindbeoordeling was te zien dat aantasting wel meer zichtbaar was binnen in de stengelvoet. Bij de positieve controle was bij 29% van de planten aantasting aan de binnenkant van de stengelvoet zichtbaar (Figuur 3.30), maar ook hier was de aantasting niet ernstig. De behandeling champost hoog was de enige behandeling waarbij helemaal geen aantasting binnen in de stengelvoet was waargenomen (Figuur 3.30, 3.31).



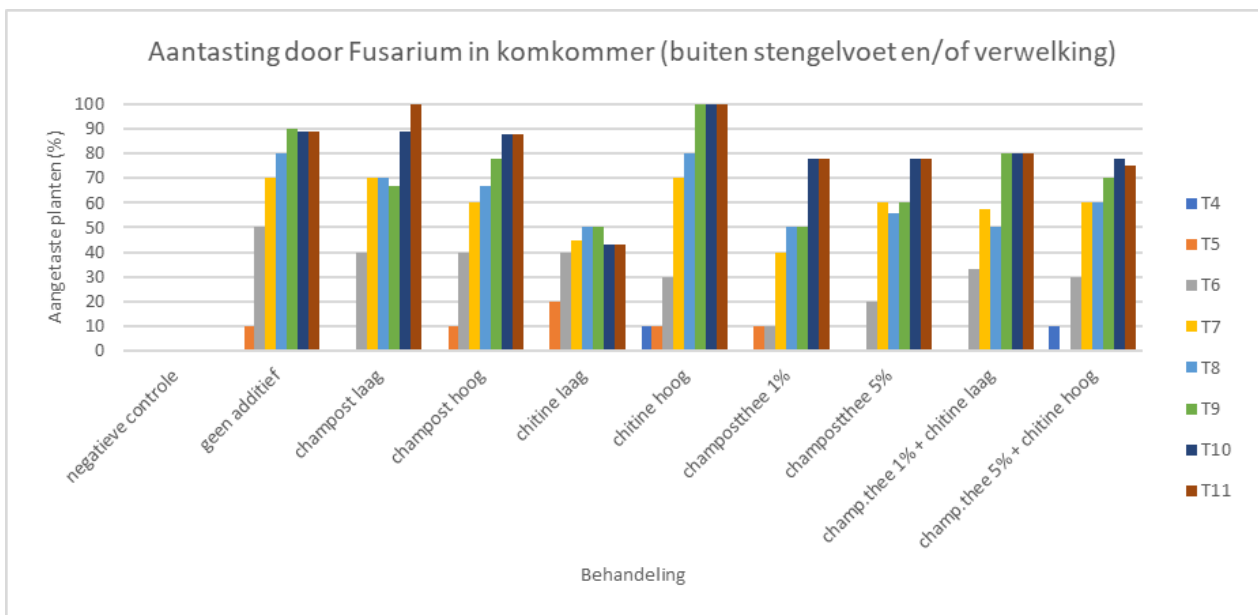
Figuur 3.30 Percentage komkommerplanten aangetast door *Pythium* aan de binnenkant van de stengelvoet van verschillende behandelingen aan het eind van de proef (week 12).



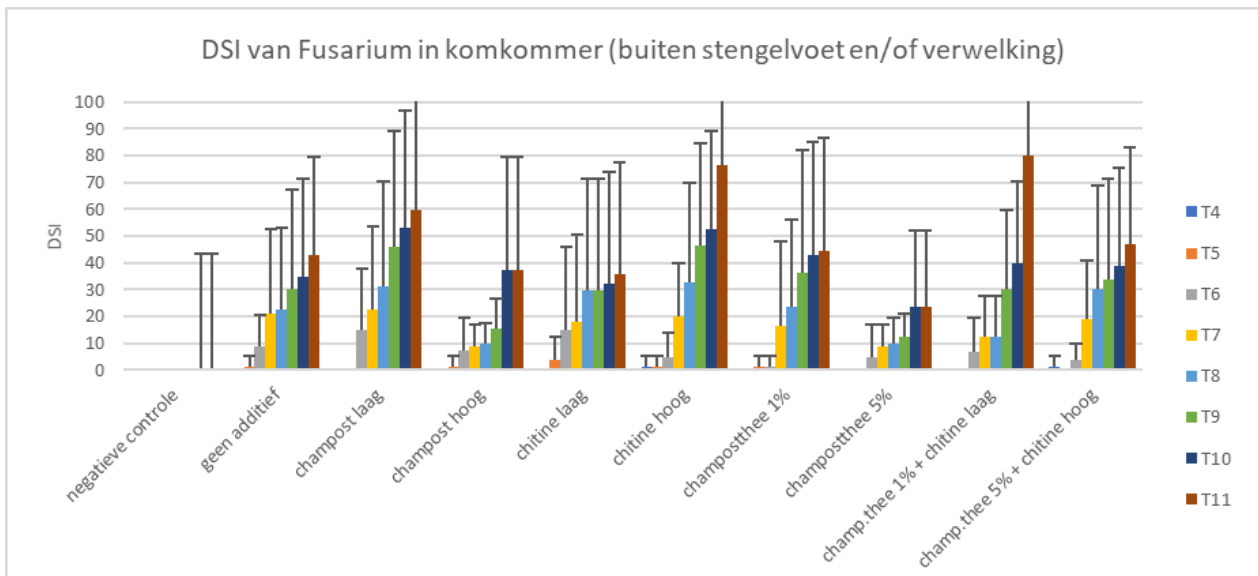
Figuur 3.31 Gemiddelde score van aantasting door *Pythium* (DSI-Disease Severity Index; met standaard deviatie, SD) aan de binnenkant van de stengelvoet van komkommerplanten van verschillende behandelingen aan het eind van de proef (week 12). DSI geeft de mate van ziekte aan (0-100). Hoe hoger de DSI, hoe meer ziekte.

3.5.3 Ziekteontwikkeling door *Fusarium*

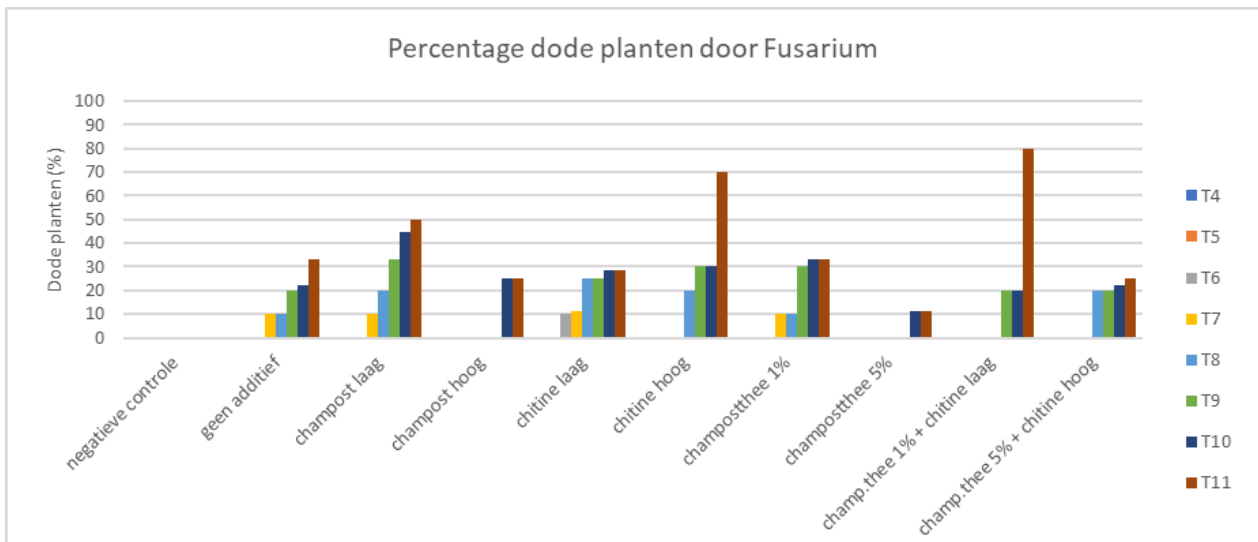
Gedurende de proef was er bij de planten geïnoculeerd met *Fusarium* duidelijk aantasting aan de buitenkant te zien. Aan het eind van de proef was bij 89% van de planten van de positieve controle vergeling, verwelking en/of aantasting zichtbaar aan de buitenkant van de stengel (Figuur 3.32). Chitine laag had het minst aantal aangetaste planten, namelijk 43%. De gemiddelde score voor aantasting was bij champostthee 5% het laagst (Figuur 3.33). 33% van de planten van de positieve controle was zelfs helemaal dood door ziekte. De behandeling champostthee 5% had met 11% het minst aantal dode planten (Figuur 3.34).



Figuur 3.32 Ontwikkeling van aantasting door *Fusarium* aan de buitenkant van de stengelvoet en/of verwelking/vergeling van komkommerplanten in verschillende behandelingen over de tijd.



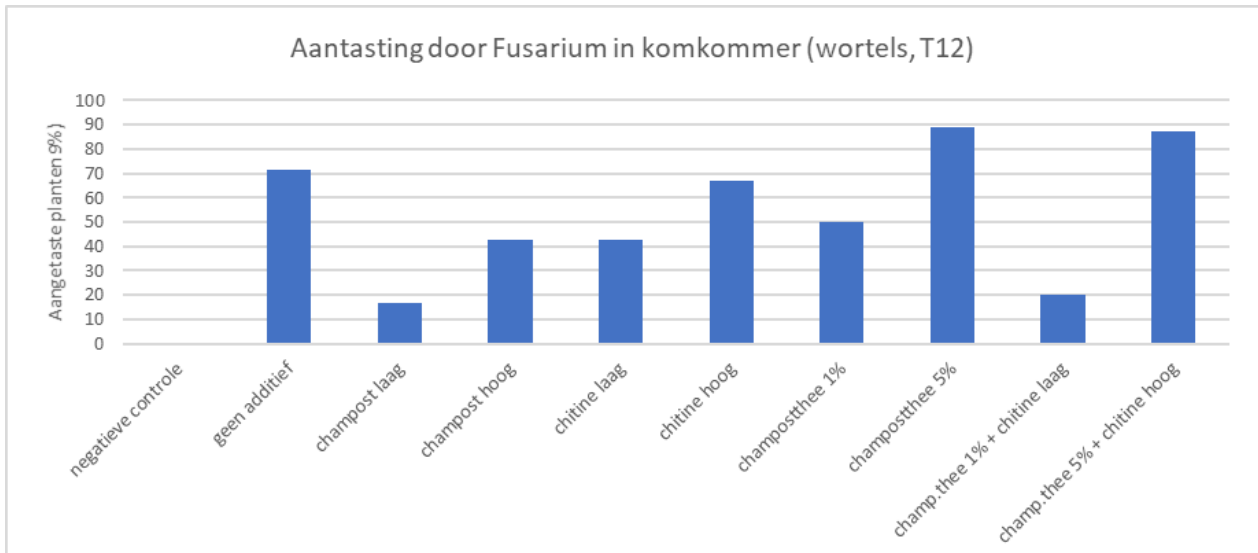
Figuur 3.33 Gemiddelde score aantasting door Fusarium (DSI- disease severity index; met standaard deviatie, SD) aan de buitenkant van de stengelvoet en/of verwelking/vergeling van komkommerplanten in verschillende behandelingen over de tijd.



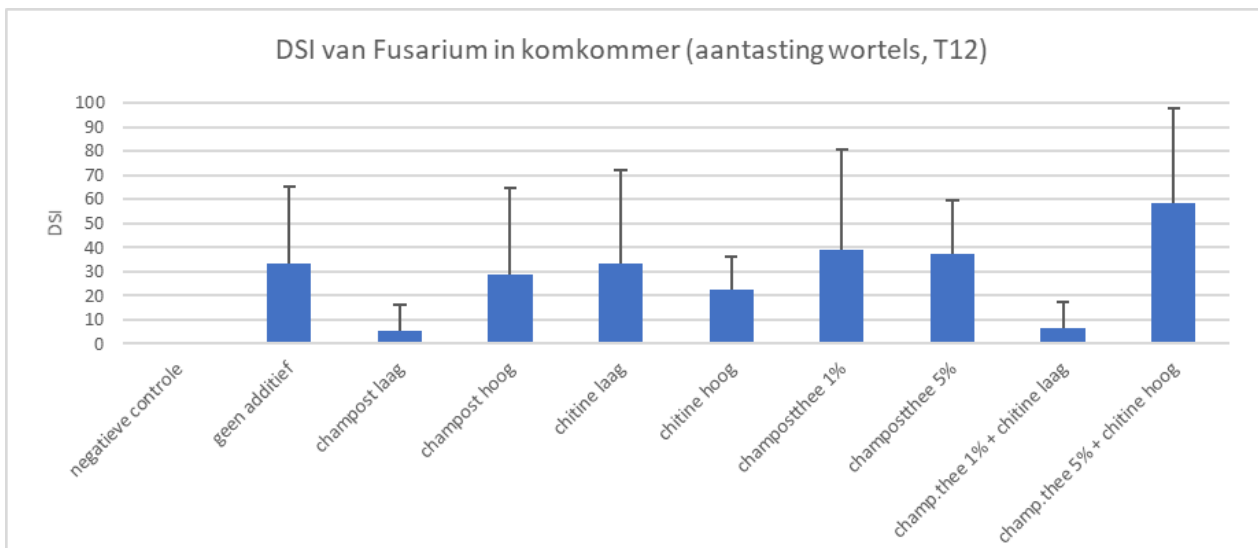
Figuur 3.34 Percentage dode komkommerplanten, veroorzaakt door Fusarium, in verschillende behandelingen over de tijd.

Bijna alle stengels waren aan de binnenkant zichtbaar aangetast met Fusarium. Er was geen duidelijk verschil tussen behandelingen en de positieve controle. Ook in de mate van aantasting zijn geen duidelijke verschillen waargenomen.

Bij de positieve controle is bij 71% van de planten aantasting van de wortels waargenomen. Bij champost laag had 17% van de planten zichtbare aantasting bij de wortels (Figuur 3.35). Bij champost laag was ook de gemiddelde score het laagst (Figuur 3.36). Er zijn geen duidelijke verschillen in beworteling waargenomen.

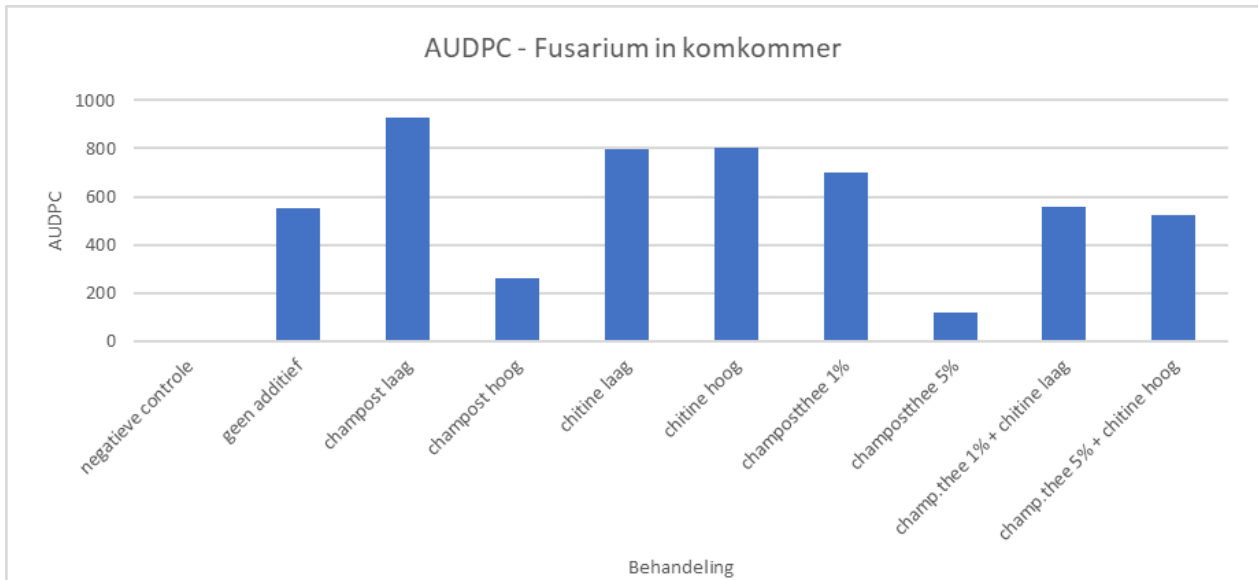


Figuur 3.35 Percentage komkommerplanten aangetast door Fusarium aan de wortels van verschillende behandelingen aan het eind van de proef (week 12).



Figuur 3.36 Gemiddelde score van aantasting door Fusarium (DSI- disease severity index; met standaard deviatie, SD) aan de wortels van komkommerplanten van verschillende behandelingen aan het eind van de proef (week 12). DSI geeft de mate van ziekte aan (0-100). Hoe hoger de DSI, hoe meer ziekte.

Als gekeken wordt naar de ziekteontwikkeling over de tijd door middel van het bepalen van het oppervlakte onder de ziekte progressie curve, is er vertraging van de ziekte ontwikkeling te zien bij behandeling met champost hoog en champostthee 5% (Figuur 3.37).



Figuur 3.37 Oppervlakte onder de ziekte progressie-curve (eng. AUDPC-area under the disease progress curve) van *Fusarium* infectie in komkommer in verschillende behandelingen. Week 4 t/m 12.

3.6 Toepassing Rekentool op proef in 2021

De Rekentool heeft een schatting gemaakt van de omzetting van koolstof en stikstof in organische naar minerale vorm. Hierbij zijn de volgende organische stof stromen verwerkt:

- Wortel-exudaten en -resten
- substraat
- toeslagstof
- meststof

De Rekentool kan de omzettingen berekenen door een dagelijkse boekhouding van (A) inkomende stofstromen, (B) uitgaande stofstromen, (C) resulterende dagelijkse voorraadverandering in het substraat. De uitgaande stofstromen voor koolstof in de rekentool bestaan uit:

- CO₂-emissie uit het systeem na afbraak van organische stof
- Afvoer C via de drain

Conversie van de ene naar de andere koolstofhoudende component wordt beschouwd als tussenstap binnen de totale afbraak en wordt nu niet meegenomen. Dit betreft bijvoorbeeld overgang van vaste fase naar een opgeloste vorm (TOC in waterfractie van substraat) of van stabiele naar labiele organische stof zoals in het model MOTOR (De Visser et al, 2006; Whitmore et al., 1997).

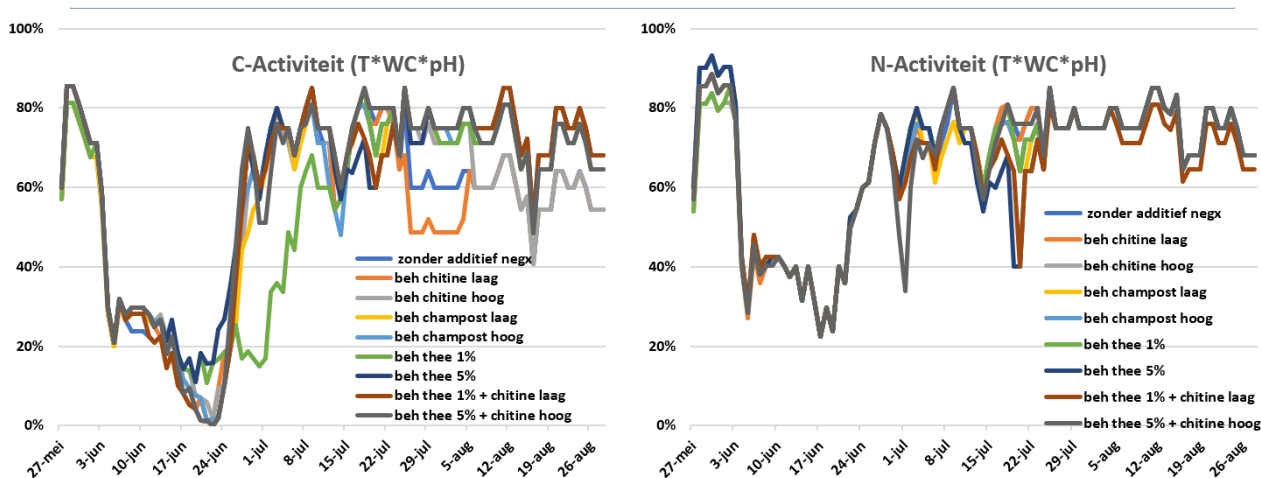
De afbraak van deze organische componenten wordt berekend met de volgende functie:

$$C\text{-afbraak} = \text{maximale C-afbraakfractie} \times C\text{-voorraad} \times \text{klimaatteffect.}$$

De parameter "maximale afbraakfractie" kan experimenteel worden vastgesteld met de OUR-methode. Het klimaatteffect is 100% bij optimale temperatuur, watergehalte en zuurgraad. Bij suboptimale klimaatcondities gelden de drie functies omschreven in §2.8.2. Een voorbeeldberekening is weergegeven in Figuur 3.38 voor een periode van 14 dagen. In Figuur 3.39 is de dagelijkse afbraakactiviteit ten aanzien van organische C en N in de proef in 2021 weergegeven. Er zijn grote schommelingen te zien die vooral door de droogte veroorzaakt werden.

Dag 1-14:		D1	D2	D3	D4	D5	D12	D13	D14
Actuele waarde	T	20	20	20	20	22	20	20	20
Actuele waarde	WG	55	55	55	50	50	35	35	30
Actuele waarde	pH	6	6	6.5	6.5	7.5	4.5	4	4
Activiteit%	T	70%	70%	70%	70%	90%	70%	70%	70%
Activiteit%	WG	100%	100%	100%	100%	100%	70%	70%	50%
Activiteit%	pH	80%	80%	100%	100%	100%	20%	10%	10%
Gecombineerd%		56%	56%	70%	70%	90%	10%	5%	4%
Maximale Activiteit	mg/h	50	50	50	50	50	50	50	50
Actuele Activiteit	mg/h	28	28	35	35	45	4.9	2.45	1.75

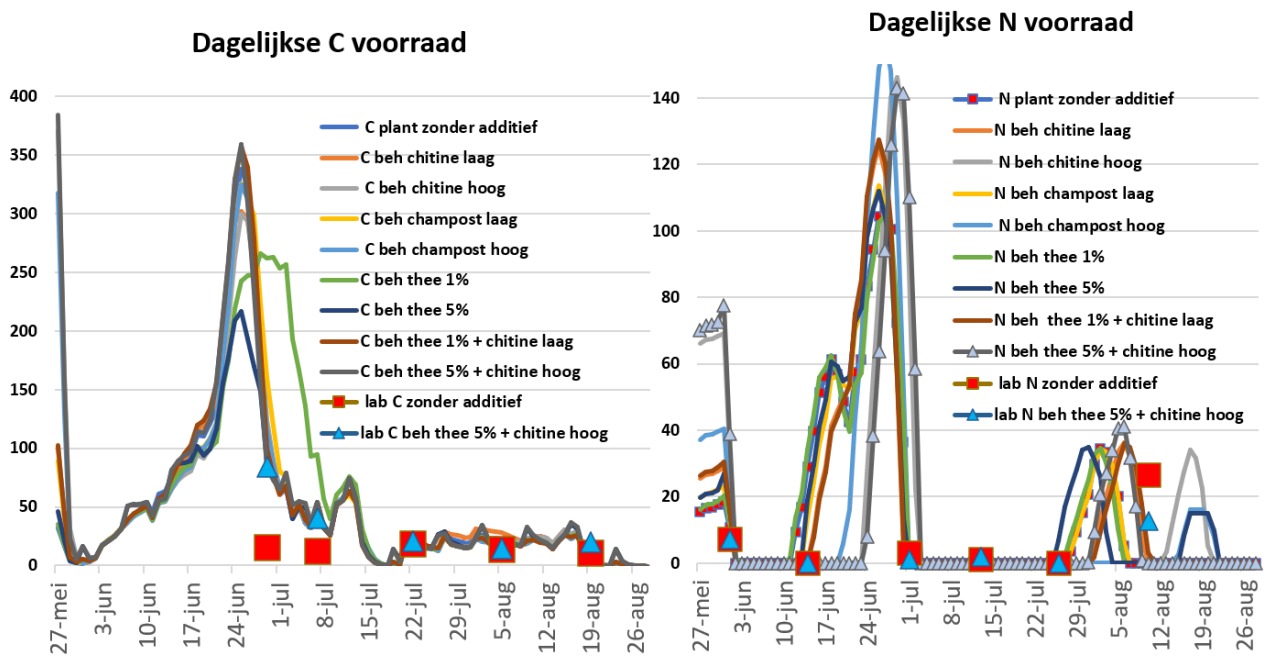
Figuur 3.38 Voorbeeld van een berekening van de actuele activiteit van de afbraak van organische stof. Deze actuele activiteit voor de betreffende dag (D1 t/m D14) is afhankelijk van de dagwaarde voor temperatuur (T), watergehalte (WG) en zuurgraad (pH), die het percentage t.o.v. de maximale activiteit bepalen.



Figuur 3.39 Actuele afbraakactiviteit (in % van maximaal) voor organische koolstof en stikstof, zoals berekend voor de abiotische condities (T, watergehalte-WC, pH) in de proef in 2021.

De voorraadverandering in het substraat qua C en N is het gevolg van aanvoer minus afvoer van C en N. De resulterende voorraad is goed meetbaar, door meten van C en minerale N in bodemvocht en uitwisselcomplex, en in de voorraad in de vaste organische stof. De gemeten en berekende voorraadverandering komen goed over een (Figuur 3.40) mits voor stikstof alleen naar ammonium wordt gekeken, en tijdstip van de meting wordt aangepast met 4 dagen. Dit is te verklaren doordat er een vertraging zit in het vrijkomen van ammonium uit de mineralisatie.

Deze eerste kalibratie van de Rekentool is veelbelovend. Inzet van de Rekentool in een praktijkteelt kan de geldigheid voor andere situaties goed in beeld brengen. Hiervoor is de proef bij Van der Knaap gebruikt (zie Hoofdstuk 4).



Figuur 3.40 Dagelijkse voorraad (mg/m²/d) aan koolstof (C) en stikstof (N) in het substraat, berekend (lijnen) en gemeten voor behandeling zonder additief (rode blokjes) en thee-5% + chitine-hoog (blauwe driehoeken).

4 Validatie rekentool

4.1 Opzet

Het kasklimaat en abiotische substraatcondities van de kasproef in 2021 zijn in de rekentool als input gebruikt (zie §2.8.2 voor uitleg van de rekenregels). De gemeten substraatconcentraties van een bemestingsproef bij Van der Knaap werden gebruikt om de uitkomsten van de rekentool te verifiëren. De volgende secties beschrijven de resultaten.

Proef bij Van der Knaap

Van 02-12-2022 tot 09-03-2023 is bij Van der Knaap Group in Honselersdijk een afdeling met paprika van een Venlo kas gebruikt voor een validatie van het model. Het gebruikte compartiment was ingericht voor het telen van paprika in een nieuw teeltsysteem. Het nieuwe teeltsysteem is ontwikkeld om planten te telen op uitsluitend organische meststoffen. Het betrof netto 190 m² kas met 1.18 bakken/m² met drie planten per bak. De bakken van 75x46x15 cm waren gevuld met 52 L/bak (61 L/m²) kokosmaterialen 50/50%v/v. De planten waren opgekweekt in kokospluggen en kokosblokken (Figuur 4.1).



Figuur 4.1 Links een overzicht van de kas met teeltbakken en drie paprikaplanten per bak. Rechts een detail van de doseerplek voor vaste meststoffen (lichte streep) met de regenleiding daarboven.

Het nieuwe systeem verschilt ingrijpend van andere teeltsystemen omdat rekening is gehouden met een aantal randvoorwaarden. De randvoorwaarden zijn:

- a. Vooraf is bekend hoeveel voeding het gewas tijdens de gehele teelt nodig zal hebben en hoe de vraag over de tijd varieert, dus minder voor een kleine plant en meer als de hoeveelheid straling hoger is.
- b. Een deel van de benodigde meststoffen wordt vóór het planten in de vorm van vaste organische meststoffen door het groeimedium gemengd. Deze voorraadbemesting is bedoeld om een zo groot mogelijk deel van de voeding vooraf in de wortelomgeving te brengen. Deze voorraadbemesting is beperkt, door de ermee gepaard gaande zoutlast, tot minder dan 10% van de totaal benodigde meststoffen. De hoge meststoffenbehoefte wordt veroorzaakt door de lange teeltduur en de in kasteelten bijzonder hoge productie.
- c. Een tweede deel van de organische meststoffen wordt, in de vorm van vaste organische meststoffen, ongeveer eens per 4 weken op het groeimedium gedoseerd. Ook hier zou een hogere gift leiden tot een te hoge zoutlast. Om vaste meststof te kunnen doseren zijn aanpassingen van het teeltsysteem essentieel:
 - Er moet voldoende ruimte tussen de planten zijn om de meststoffen te kunnen plaatsen zonder de stengels te raken (om zoutschade aan de stengel te voorkomen).
 - De bovenkant van het groeimedium moet toegankelijk zijn, er is daarom geen afdekfolie gebruikt.

- o Boven de vaste meststoffen ligt een regenleiding waarmee de vaste meststoffen kunnen worden besproeid zodat de microbiële vrijgemaakte voedingsionen worden getransporteerd naar de dieper liggende wortels. Tegelijk neemt door de besproeiing de vochtigheid en daarmee de omzetsnelheid van de vaste meststoffen door microbiële activiteit toe. De omzetsnelheid is dus enigszins regelbaar.
 - o Het volume groeimedium per oppervlakte eenheid kas moet hoger zijn dan bij de huidige standaardteelt (60 L/m² in plaats van 10 L/m² voor een steenwolteelt). Dit is nodig om voldoende liters te hebben voor het omzetten van de aangevoerde organische stikstof naar plantopneembare anorganische stikstof. Een groter volume helpt ook om meer ruimte tussen de planten te hebben voor het doseren van vaste meststoffen.
- d. Een derde en laatste deel van de meststoffen wordt in vloeibare vorm aangevoerd met een regenleiding waarvan de sproeidop boven de gedoseerde vaste meststoffen hangt (zodat de vaste meststoffen nog in het groeimedium ingeregend worden). Met dit systeem kan desnoods meerder keren per dag voeding worden aangevoerd zodat de vraag van de planten precies kan worden gevolgd met de aanvoer. De aanvoer via de regenleiding mag, over de teelt gerekend, niet meer dan 50% van de totale stikstofgift zijn. Deze eis is niet plantkundig, maar een regel voor het ecologisch telen volgens een bepaald certificaat. Die regel is dat meer dan 50% van de aangevoerde stikstof in de wortelomgeving ter plekke moet worden omgezet van organische stikstof naar minerale stikstof.

Behandelingen

In de proef zijn twee behandelingen aangelegd en gevolgd, namelijk de referentiebehandeling A en een behandeling B die op één dag een dubbele hoeveelheid vaste meststoffen kreeg toegediend. De bedoeling van de tweede behandeling was, na te meten of een plotselinge dubbele aanvoer ook zou leiden tot een tijdelijke hoge piek in de plant beschikbare elementen. Verwacht werd dat de afbraak voor koolstof binnen 1-3 dagen en voor stikstof binnen 14 dagen zou leiden tot een piek in beschikbaar maar nog niet opgenomen koolstof of stikstof. Bij de stikstof werd verwacht dat een piek in beschikbare ammonium vooraf zou gaan aan een piek in beschikbare nitraat. Dat laatste omdat nitraatvormende bacteriën pas actief worden bij een hoger aanbod van ammonium en bekend staan om hun trage groei. De dubbele gift vond plaats op 23 januari 2023.

Waarnemingen ten behoeve van het model

Dit betreft:

- De abiotische factoren die de microbiële activiteit bepalen; namelijk substraat temperatuur (dagelijks), substraat pH (wekelijks) en substraat watergehalte (1/2 wekelijks).
- De aanvoer van koolstof uit:
 - o Het groeimedium. Er is uitgegaan van 61 L/m² met een droge bulk dichtheid van 125 kg/m³. Verder is uitgegaan van 90%w/w organische stof met daarin 45%w/w koolstof. Als we aannemen dat de afbraak 1%w/w per 100 dagen is, volgt hieruit dat er 3051 mg/m²/d vrijkomt.
 - o De voorraadbemesting van vaste mest. Er is aangenomen dat er nog 33% vaste meststoffen in het groeimedium aanwezig waren bij aanvang van de teelt (5000 mg koolstof per m²). Omdat het groeimedium voor een tweede seizoen gebruikt is, is verondersteld dat het voorgaande gewas het groeimedium voor 75% had leeggegeten.
 - o De aanvoer van vaste mest. Op 3 tijdstippen is tijdens de meetperiode vaste organische mest aangevoerd (Tabel 4.1). Deze mest is een mengsel van eiwitrijke organische meststoffen. De samenstelling van het mengsel is per keer apart ingesteld op basis van de berekende behoefte van het gewas en de wekelijkse voedingsanalyses van het groeimedium.

Tabel 4.1 Aanvoer van vaste mest in twee behandelingen (A, ref, B, dubbel). Er is gerekend met: 1.18 containers per m²; een organisch stofgehalte van 100%w/w; een koolstofgehalte van 50%w/w; een snelheid van vrijkomen van de meststof van 3%w/w per dag. Mestgiftniveau (X) en organisch stofgehalte (Y) zijn vertrouwelijke informatie.

Datum	Behandeling							
	A	B	A	B	A	B	A	B
	g/container	g/container	OM g/m ²	OM g/m ²	C g/m ²	C g/m ²	C mg/m ² /d	C mg/m ² /d
05-Dec-22	X	X	Y	Y	Y/2	Y/2	30 * Y/2	30 * Y/2
02-Jan-23	X	X	Y	Y	Y/2	Y/2	30 * Y/2	30 * Y/2
23-Jan-23	1.4 * X	1.4 * X	1.4 * Y	1.4 * Y * 2	1.4 * Y * 1	1.4*Y/2	30*1.4*Y/2	30*1.4*Y

- o De aanvoer bij gebruik van vloeibare organische mest. De vloeibare organische mest wordt geproduceerd in een door van der Knaap Group ontwikkelde reactor, een oxidatieve bioreactor. Hierin worden voedingsstoffen uit toegevoerd materiaal vrijgemaakt door bacteriële afbraak en omzettingen (Blok e.a., 2022a). De aanvoer van koolstof vanuit de reactor is laag omdat bijna alle koolstof al in het reactorvat vrijkomt en daar is afgevoerd als koolzuurgas. Er is gerekend met een (gemeten) koolstofgehalte in de aangevoerde mest van 12 mg koolstof per liter. Een aanvoer van 1.5 L/m²/d resulteert dus in een koolstofaanvoer van 18 mg/m²/d (Tabel 4.2).
- o De plant. De bijdrage van de plant varieert waarschijnlijk met grootte en ontvangen straling, maar is hier op basis van literatuur gezet op 600 mg/m²/d (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Aanvoer van koolstof en stikstof uit verschillende bronnen. De totale opgetelde aanvoer is bedoeld als voorbeeld en geeft een statische toestand weer, de toestand in de kas verandert van dag tot dag.

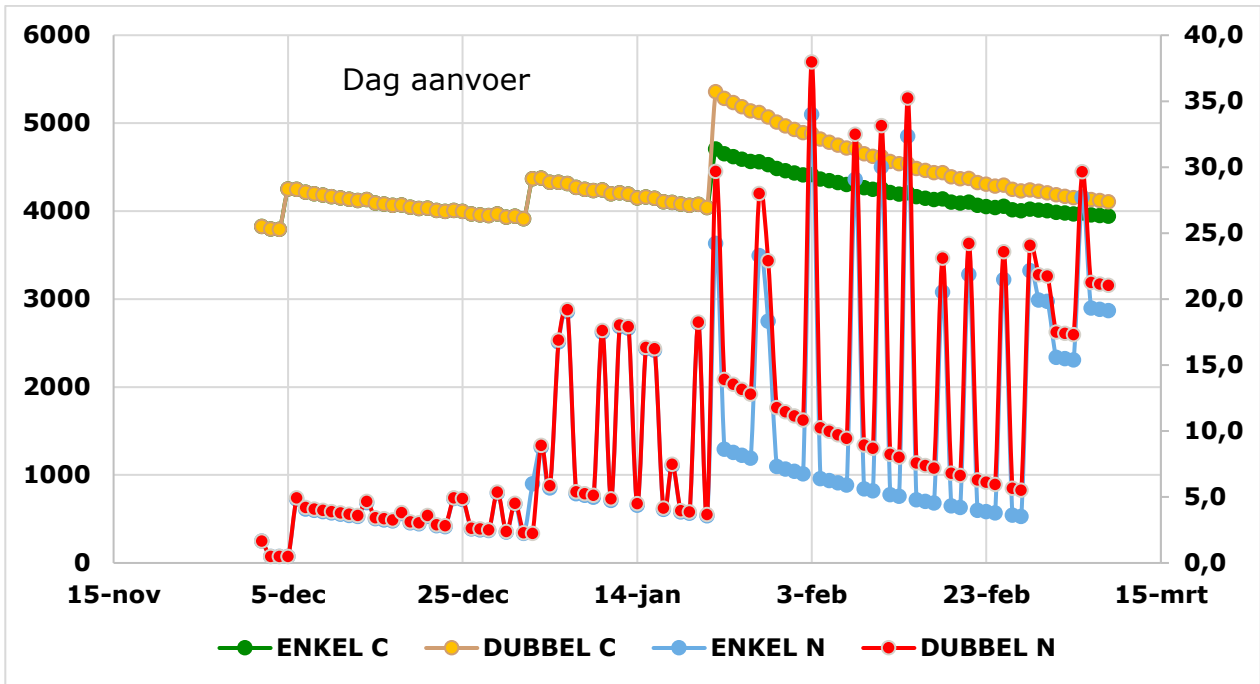
Bron	Massa	Organische stof	Koolstof	Stikstof	Afbraak	Mass C	Massa N
	g/m ²	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	mg/m ² /d	mmol/m ² /d
Groeimedium	750	90	45.2	0.3	1/100d	3051	0.5
Voorraad mest	10	100	50		3	0	1.2
Vaste mest 5 Dec 2022	31.8	100	50		3	477	3.7
Vloeibare mest 1.9/m ² /d 05-01-2023						28.3	11.2
Plant						600	
Totaal						4156	16.7

4.2 Resultaten

Figuur 4.2 toont de dagelijkse aanvoer van koolstof en stikstof per vierkante meter teeltoppervlak. Voor koolstof is te zien hoe de aanvoer van koolstof vanuit het groeimedium zo groot is dat effecten van de aanvoer uit vaste en vloeibare mest of de plant daarbij in het niet vallen. Er komt ruim 3000 mg/m²/d uit het groeimedium. Dit hangt samen met het volume groeimedium nodig in dit nieuwe teeltsysteem, dat met 61 L/m² zes tot tien maal groter is dan de volumes in de huidige op kokos of steenwol gebaseerde teeltsystemen.

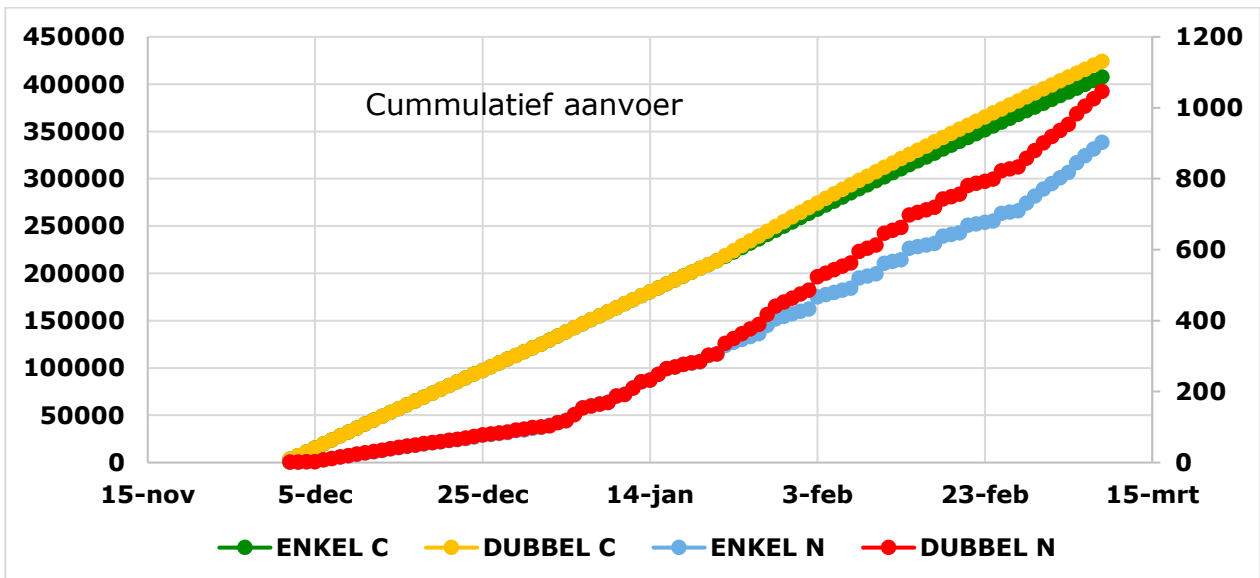
Op 23 januari, bij een dubbele gift vaste mest voor behandeling 2, neemt de hoeveelheid koolstof die op die dag vrij komt toe met 12%, van 4700 tot 5300 mg/m²/d. De aanvoer van koolstof in de tijd is dus erg hoog en erg gelijkmatig, waardoor de invloed van de vaste mest dosering op de microbiële activiteit dus relatief gering lijkt te zijn.

De aanvoer van stikstof is veel kleiner dan de aanvoer van koolstof. Voor een goede vergelijking zou de koolstof hier ook uitgedrukt kunnen worden in mmol/m²/d. Omdat 1 mol koolstof 12 gram weegt, zouden de getallen op de linker Y-as dan allemaal iets meer dan 10 keer zo klein worden. Ook dan komt er dus per dag ruim 20 keer meer koolstof dan stikstof vrij. Een C:N verhouding van 20 wordt gezien als een belangrijke indicatie voor stabiele microbiële omstandigheden. Tot nu toe is voor koolstof de eenheid mg gekozen omdat deze eenheid in onderzoek en praktijk (TOC meting) al gebruikt wordt.



Figuur 4.2 De dagelijkse aanvoer van koolstof (in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dag}$, linker Y-as) en stikstof (in $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{dag}$, rechter Y-as). Voor koolstof overlapt de oranje lijn (Behandeling 2, dubbele gift vaste mest op 23 januari) de groene lijn (standard gift vaste mest). Voor stikstof overlapt de rode lijn (Behandeling 2, dubbele gift vaste mest op 23 januari) de blauwe lijn (standard gift vaste mest).

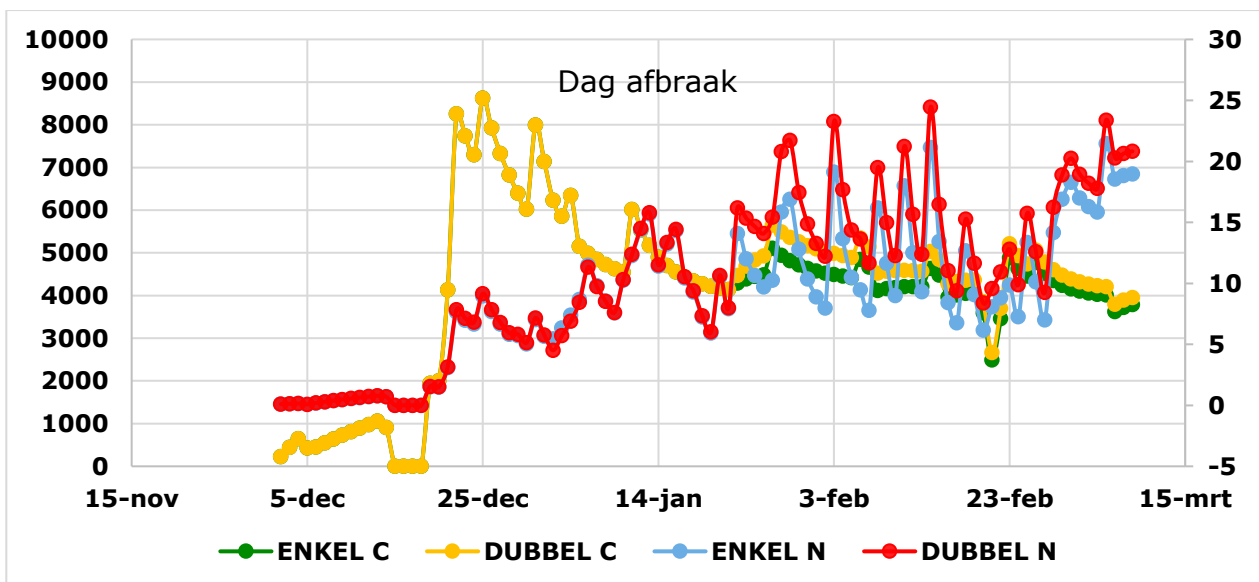
Duidelijk is dat de aanvoer van stikstof veel minder stabiel verloopt dan de aanvoer van koolstof. Dat komt omdat het niveau van stikstof in het groeimedium voor een goede groei van het gewas niet al te hoog mag worden (onder de 20 mmol/L) terwijl het verbruik van stikstof door opname in de planten hoog is en bovendien sterk schommelt door wisselingen in instraling. Daarom wordt een flink deel van de stikstof (zo'n 50%w/w) via de irrigatieleiding gegeven. Die aanvoer via de irrigatieleiding is terug te zien als een serie scherpe aanvoerpieken in Figuur 4.2. Voor Figuur 4.2 geldt dat de neergaande lijn na een piek alleen betekent dat er de volgend dag minder aangevoerd wordt, **niet** dat er stikstof verdwijnt.



Figuur 4.3 Cummulatieve aanvoer van koolstof (in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dag}$, linker Y-as) en stikstof (in $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{dag}$, rechter Y-as).

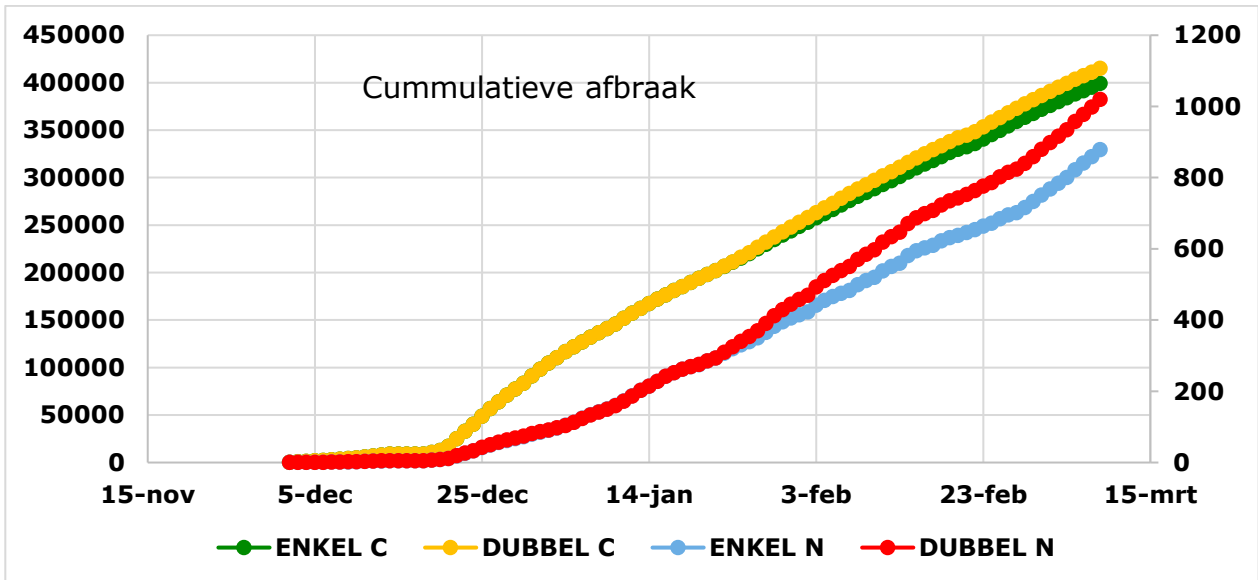
In Figuur 4.3 is de cumulatieve aanvoer van koolstof en stikstof te zien. Nu is nog duidelijker dat de koolstofaanvoer maar weinig beïnvloedt wordt door de behandelingen, terwijl de stikstofaanvoer bijna 15% hoger wordt in behandeling 2 (dubbele gift vaste mest op 23 januari). Verder is te zien dat de C/N verhouding (na omrekenen van de koolstofaanvoer naar $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$) de eerste weken van de teelt, tot 02 januari, op 100 ligt en aan het einde van de waarneemperiode op 30. Dit zou kunnen betekenen dat de omzettingssnelheid in het begin aan de lage kant lag.

In Figuur 4.4 Wordt de dagelijkse berekende afbraak getoond. Dit verloop is opmerkelijk onevenwichtig omdat in de eerste 14 dagen de afbraak van zowel koolstof als stikstof erg langzaam verloopt. Dit hangt samen met het lage gerapporteerde watergehalte van het groeimedium in die periode (30%v/v) en een periode met een lage bodemtemperatuur. Bij 30%v/v is de geschatte activiteit van de micro-organismen maar 10% van de potentieel mogelijke activiteit (bij het optimale watergehalte van 73%v/v). Het lage watergehalte beïnvloedt zowel het vrijkomen van koolstof als de omzettingen van stikstof. Vanaf 19 december is er een sterke toename in de afbraak zichtbaar, vooral voor koolstof. Dit is waarschijnlijk een rekenkundig effect omdat het model veronderstelt dat de aanvoer vanuit het groeimedium elke dag doorloopt, ook als er geen afbraak is. Na een periode van zich ophopende aanvoer wordt er dan een groter percentage van de opgehoopte aanvoer afgebroken. Voor stikstof is dit minder duidelijk omdat de aanvoer bij aanvang van de teelt kleiner is en gaande de teelt toeneemt. Dat patroon is ook terug te zien in de afbraak die met een kleine vertraging de aanvoer altijd bijhoudt.



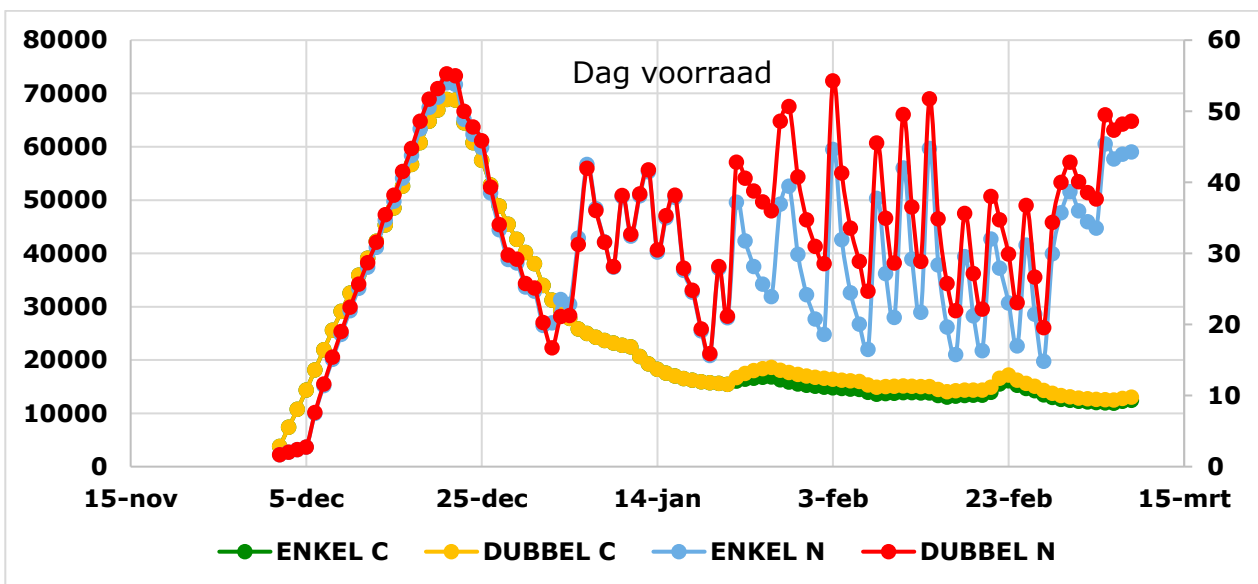
Figuur 4.4 Dagelijkse afbraak van koolstof (in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dag}$, linker Y-as) en stikstof (in $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{dag}$, rechter Y-as).

In Figuur 4.5 is de cumulatieve afbraak te zien. Over een langere periode zal de cumulatieve afbraak gelijk zijn aan de cumulatieve aanvoer (anders zouden afbraakproducten zich blijvend ophopen). Kleine verschillen in het verloop van de curve voor aanvoer en voor afbraak komen overeen met perioden van ophoping (waarbij de microbiële activiteit de aanvoer niet kan bijhouden) en intering (waarbij de microbiële activiteit de aanvoer overtreft). Dit verschil is de dagvoorraad, die in Figuur 4.6 is te zien. De dagvoorraad is de mogelijkheid voor telers om meetwaarden te vinden die als feedback kunnen dienen op de door het model geschatte activiteit (de dagafbraak). Daarna kan een teler bijsturen mits er genoeg verklarende meetwaarden zijn van dagaanvoer, en abiotische factoren temperatuur, watergehalte en zuurgraad.



Figuur 4.5 Cummulatieve afbraak van koolstof (in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dag}$, linker Y-as) en stikstof (in $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{dag}$, rechter Y-as).

De dagvoorraad in Figuur 4.6 toont een behoorlijke piek in koolstofbeschikbaarheid tussen 10 en 31 december. Voor stikstof is het verloop juist heel gelijkmatig, ondanks de dubbele aanvoer op 23 januari. Het verwachte niveau van koolstof is $15000 \text{ mg}/\text{m}^2$. Dat komt bij een volume van iets meer dan $60 \text{ L}/\text{m}^2$ neer op ongeveer 250 mg koolstof per liter groeimedium. Voor totaal stikstof is dit $30 \text{ mmol}/\text{m}^2$, wat neerkomt op een voorraad van maar $0.5 \text{ mmol}/\text{L}$ groeimedium.

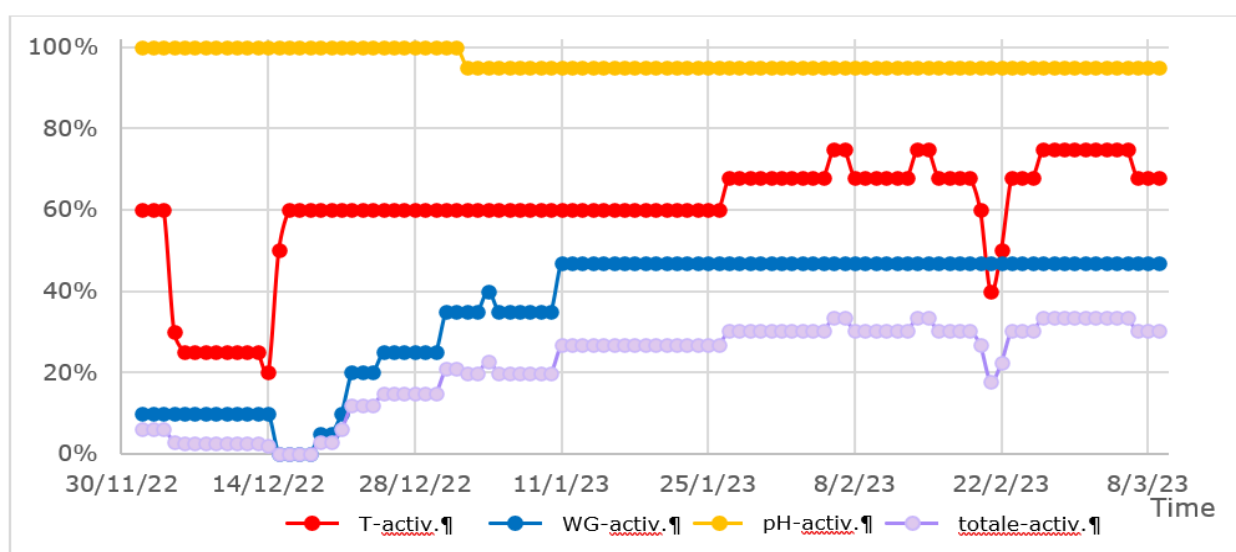


Figuur 4.6 Berekende dagvoorraad van koolstof (in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dag}$, linker Y-as) en stikstof (in $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{dag}$, rechter Y-as). Voor koolstof overlapt de oranje lijn (Behandeling 2, dubbele gift vaste mest op 23 januari) grotendeels de groene lijn (standard gift vaste mest). Voor stikstof overlapt de rode lijn (Behandeling 2, dubbele gift vaste mest op 23 januari) de blauwe lijn (standard gift vaste mest) tot 23 januari.

4.3 Inzetbaarheid in de teeltpraktijk

De rekentool kan nog niet in zijn geheel ingezet worden in de praktijk. Dit komt omdat gerekend is met de maximale afbraaksnelheid alsof dit een aanvoer van koolstof en stikstof is. De dagvoorraad is dan een de rest van de dag ervoor plus wat er deze dag niet afgebroken wordt. In werkelijkheid wordt de maximale afbreeksnelheid niet echt aangevoerd en dient de waarde alleen om uit te rekenen hoeveel trager de afbraak verloopt door dat de abiotische factoren (temperatuur, watergehalte en zuurgraad) niet optimaal waren. Bij grote aanvoer, zoals in dit geval door de grote hoeveelheid liters groeimedium per vierkante meter, leidt dat tot veronderstelde ophopingen die niet werkelijk voorkomen. Om dit op te lossen moet dit stuk van het model herschreven worden.

De voorspelde microbiële activiteiten zijn al wel waardevol omdat ze een waarschuwing geven aan telers over de consequenties van een suboptimale instelling die de plant op korte termijn veel minder ingrijpend beïnvloed dan de microbiologie. Figuur 4.7 illustreert dat de vrij lage activiteit aan het begin veroorzaakt wordt door een laag watergehalte en een lage temperatuur.



Figuur 4.7 De procentuele invloed van temperatuur, watergehalte en zuurgraad op de afbraak van groeimedium en vaste meststoffen per factor (T, WG en pH) en gecombineerd tot totale activiteit.

Het verrekenen van de invloed van de abiotische factoren op de afbraaksnelheid van groeimedia en meststoffen is rekenkundig niet bijzonder moeilijk maar vereist wel een goede validatie van de maximale afbraaksnelheid, dat is de afbraaksnelheid onder optimale -niet limiterende- omstandigheden. Voor de tuinbouw geven de al bekende metingen van afbraaksnelheid van groeimedia, de OUR metingen, hiervoor gemeten waarden. De maximaal afbraak snelheid van kokos met de OUR methode is ongeveer 2.5 mmol/uur/kg is (mmol zuurstof per uur per kilogram droge organische stof). Deze waarde kan worden omgerekend tot een maximale afbraak van het groeimedium in de bakken van ongeveer 2500 mg koolstof per vierkante meter per dag. Dat is maar iets lager dan de aangenomen 3051 mg/m². Omdat deze snelheid geldt bij optimale temperatuur, watergehalte en zuurgraad, is dit in de kas gemiddeld 2-5 keer lager, ongeveer 800 mg/m²/d.

Tabel 4.3 Waarden voor koolstof (TOC) en stikstof (ammonium) in monsters uit de teeltbakken in drieboud. Aanvoer van koolstof en stikstof uit verschillende bronnen. De totale opgetelde aanvoer is bedoeld als voorbeeld en geeft een statische toestand weer, de toestand in de kas verandert van dag tot dag.

	Behandeling	Koolstof		Stikstof	
		Model waarde	Gemeten waarde	Model waarde	Gemeten waarde
		Vloeistofmonster	Vloeistofmonster	Vloeistofmonster	Vloeistofmonster
		mgC/L	mgC/L	mgNH ₄ /L	mgNH ₄ L
10-12 dec	A (ref)	250	66	0.5	0.5
13-15 dec	A	250	80	0.5	0.5
16-20 dec	A	250	61	0.5	0.4
21-29 dec	A	250	57	0.5	0.4
3-7 feb	A	250	84	0.5	0.5
3-7 feb	B (dubbel)			0.5	3.8
11-17 feb	A	250	83	0.5	0.5

Het is mogelijk, en voor de praktijk wenselijk om zelf de vinger aan de pols te kunnen houden, dat de voorspellingen van het model te controleren zijn met metingen van koolstof (TOC, total organic carbon) en van ammonium. In Tabel 4.3 is te zien dat deze voorspellingen nog niet goed uitpakken. De voorspelde koolstofwaarden zijn hoger dan de gevonden waarden. Voor ammonium liggen de gevonden waarden te laag om van veel waarde te zijn (waarbij de uitschieter in behandeling B op 3 februari nog onverklaard is). Er moet daarom gezocht worden naar een andere manier om voor telers snel genoeg feedback op de beweringen van het model te vinden.

4.4 Conclusies

1. Het modelgedeelte van dit project gaf inzicht in de grote biologische activiteit van dit vernieuwende teeltsysteem. De microbiële activiteit, uitgedrukt per vierkante meter, is 5-6 keer groter dan in een matten systeem door het grotere volume groeimedium. De bijdrage van de organische meststof in behandeling B op 23 januari zou in een mattensysteem de activiteit bijna verdubbelen maar voegt nu maar 17% toe aan de activiteit, en de bijdrage van de plant ligt in dezelfde orde van grootte. De metingen maken dus zichtbaar dat dit biologische systeem sterk dempend werkt op fluctuaties.
2. De betrekkelijk geringe fluctuatie in activiteit in dit bijzondere teeltsysteem illustreert een tweede les van deze proef, namelijk dat de microbiële activiteit moet worden beoordeeld op verschillende manieren. Om het risico op onbeheersbare microbiële activiteit met daarbij kans op ziekten in te schatten, moet de activiteit per liter groeimedium als criterium voor overmaat of tekort gehanteerd worden. Om het risico op een te lage omzetsnelheid met daarbij kans op voedingstekorten voor de plant in te schatten, moet de activiteit per eenheid oppervlakte -dus feitelijk in beschikbaar oppervlak per plant- geëvalueerd worden.
 - a. In (Blok e.a., 2022b) werd een grenswaarde voor instabiliteit per m² oppervlak bepaald: 2000 mg C/m²/d, voor systemen met een substraatvolume van 10 L/m². Met de ervaring van dit project kan gesteld worden dat deze grenswaarde beter geformuleerd kan worden als een grens van 200 mg C/L/d. In deze proef is namelijk zonder problemen 4000 mg C/m²/d vrijgekomen terwijl tegelijk de activiteit per liter groeimedium minder dan 70 mg C/L/d is.
 - b. Voor de plant is juist van belang hoeveel organische mest per oppervlakte eenheid omgezet kan worden en dat vermogen wordt goed weergegeven met 4000 mg C/m²/d.
3. Het model maakt de rol van de abiotische factoren temperatuur, vochtgehalte en zuurgraad inzichtelijk. De factoren temperatuur en vochtgehalte bleken in deze proef beperkend: een te lage starttemperatuur en te laag aanvangsvochtgehalte beperkten de stikstofomzettingen.

-
4. Tot nu toe veronderstelde het model dat een periode van suboptimale abiotische factoren zou leiden tot het ophopen van afbraakproducten. Dat blijkt feitelijk onjuist en wordt (achteraf gezien) verklaard door te stellen dat de aanvoer van af te breken materiaal zelf ook afhangt van de microbiële activiteit. Dat betekent dat een ophoping alleen te verwachten is als twee processen achterelkaar voorkomen en ongelijk reageren op de abiotische factoren. Daarmee vervallen -tot het model is aangepast- de TOC en NH₄ waarden als feedback controle op het model. Hoewel het modelgedeelte met de abiotische factoren en de dagelijkse afbraak van verschillende bronnen zinvolle informatie geven, blijft het belangrijk te zorgen voor door de teler toepasbare feedbackmetingen zodat een (aangepast) model met vertrouwen toegepast kan worden.

5 Discussie en conclusies

5.1 Opgedane kennis over meetmethoden wortelmilieu

De opeenvolgende proeven zijn doelbewust opgeschaald van substraat- en toeslagstof-experimenten zonder planten, vervolgens met planten, en vervolgens met toevoeging van een of meerdere pathogenen. Dit heeft tot voortschrijdend inzicht geleid, zowel in de microbiologische processen als de meetmethoden – samplingtechniek en analyses. De laatste proef in 2021 beoogde alle inzichten samen te voegen in een biotoets voor zowel *Pythium* als *Fusarium*. Hieronder volgt een chronologische, beknopte omschrijving van de opgedane kennis.

Technieken en meetmethoden

In 2019 zijn eerst organische toevoegingen aan veensubstraat getest zonder planten, waarbij metingen aan bodemvocht, stikstofomzettingen en enzymen werden ingezet om de juiste meetprocedures te ontwikkelen voor het volgen van de processen in het wortelmilieu van substraat in potten. In hetzelfde jaar is met hetzelfde substraat een proef gedaan met tomaat, waarbij de techniek van substraatbemonstering werd geoptimaliseerd.

De methode voor qPCR-bepaling, om aanwezigheid van specifieke, actieve genen te bepalen, werd ontwikkeld, waarbij ook procedures nodig waren voor de samplingtechniek, het opstellen van een ijklijn, het verdunnen in verband met storende stoffen, de extractietechniek en de keuze van de Mastermix. Ook in 2019 werd de methode van de enzymanalyse van substraatmonsters ontwikkeld.

In 2020 werd de bemonstering van het steenwol- en kokossubstraat met een appelboor ontwikkeld. De optimale positie van de monsterpunten, nabij de stengel, werd gekozen. In dat jaar werden de eerste biotoetsen gedaan, waarvoor de techniek voor opkweek van inoculum werd toegepast. Tevens was nodig om in dat jaar de toedieningstechniek van organische meststoffen en additieven te bedenken en uit te voeren. Zo moest de eiwitrijke organische bemesting opgelost worden om via de druppelleiding gegeven te worden. Tevens werd bedacht hoe de vaste stoffen chitine en champost bovenop de mat kon worden geplaatst zodat de benodigde stoffen beschikbaar kwamen voor de wortels. De meting van het enzym chitinase werd succesvol toegepast. De OUR (oxygen uptake rate)-methode werd ingezet. Er werd een observatietechniek ontwikkeld om de symptomen van *Pythium*schade te meten.

De biotoets in 2021 onderscheidde zich weer van de biotoets in 2020, zowel door de overstap van een factoriele proef naar een proef met niveaus van toeslagstof om de mate van invloed vast te stellen (zie ook uitweiding hieronder). Naast *Pythium* werd nu ook het pathogeen *Fusarium* aangebracht. Ook is het inoculum eerder toegediend om een praktijksituatie met vroege infectie na te bootsen.

In de validatieproef in 2022 is samen met de bedrijfspartner gewerkt aan een adequate methode om het bodemextract goed te meten en te vergelijken met chemische samenstelling in vocht uit rhizomen en uit drain.

Ontwerp van de proeven

Om oorzakelijke verbanden te vinden, is het in onderzoek gebruikelijk om via factoriele proeven steeds 1 factor te variëren en de andere (omgevings)factoren constant te houden. Ondanks deze intentie is dat in de proeven in 2019 en 2020 door weersinvloeden en technische tegenvallers niet het geval geweest, terwijl in 2021 de proef niet factorieel was maar situaties met/zonder of laag/hoog testte. Gelukkig blijkt er voor het totaal aan data toch een aantal logische verbanden te kunnen worden gelegd, met een min of meer 'big data' benadering waarbij het rekenmodel ingezet wordt. Zo is gevonden wat het effect van klimaatfactoren op de activiteit van een groep micro-organismen kan zijn. Eveneens is gevonden wanneer combinaties van groeimedia en meststoffen nog een stabiliserende werking hebben, ondanks de schommelingen in temperatuur, watergehalte, zuurgraad en aanvoer van een geschikte koolstofbron. Het rekenraamwerk is er, voor inzet als voorspellend model in de praktijk is het nog te vroeg. Er zullen nog de nodige tests gedaan moeten worden in (semi-)praktijkomstandigheden waarbij de relevante processen of hun eindproducten regelmatig worden gemeten.

Kennis over de enzymen betrokken bij microbiële omzettingen

De metingen van chitinase-activiteit verliepen goed en de data gaven een indicatie voor te verwachten omvormingssnelheden. Interessant is dat de chitinase-activiteit aan einde teelt voor beide meststofbehandelingen lager was met plant dan zonder, wat duidt op een effect van de plant, mogelijk door de waargenomen hogere EC of lager vochtgehalte. Op dit moment is nog niet duidelijk of het nuttig is de maximale omzettingssnelheid apart te bepalen door het inzetten van de OUR-methode als eerder omschreven.

De cellulosemeting was niet succesvol en verwacht wordt dat dit ook niet snel het geval zal worden, omdat de getoetste omzetting één van een groter aantal omzettingen is. Omdat de omzetting van cellulose bij heel veel micro-organismen de belangrijkste manier is om aan koolstof voor de groei en de energie huishouding te komen, bestaan er veel genen die bij deze omzetting betrokken zijn.

Opties voor metingen om organische stof omzettingen te kwantificeren

Voor het verwerken van de gegevens is gewerkt met de omzetsnelheid van de organische meststof gemeten uit het vrijkomen van sulfaat. Sulfaat is gekozen omdat het in goed meetbare hoeveelheden in de meststof zit (niet zoals de sporenelementen en fosfaat), niet in grote hoeveelheden door de plant wordt opgenomen (zoals nitraat en deels calcium), niet apart wordt toegediend als buffer (calcium) en omdat het niet grotendeels in oplosbare vorm in de organische stof zit (zoals de meeste kationen en nitraat).

Rekentool voor toediening van organische meststof aan het wortelmilieu

Met de gemeten substraatcondities en organische stof dynamiek zijn rekenregels opgesteld in een rekentool waarmee de stikstof- en organische stof-dynamiek wordt voorspeld. De gebouwde rekentool biedt telers en substraatleveranciers inzicht in stikstofbeschikbaarheid maar is nog niet praktijkrijp.

5.2 Discussie over de sleutelprocessen

In dit bijna vierjarige project zijn nieuwe inzichten verkregen, en de vraag is of hiermee de vragen zijn te beantwoorden die gesteld werden bij de start van het project. Hieronder worden eerst de uitgangspunten van het onderzoek genoemd. Daarna worden de bevindingen met betrekking tot de meest essentiële microbiële processen op een rij gezet en bediscussieerd.

Onze aanpak richtte zich op de rol en sturing van microbiële, functionele groepen in het wortelmilieu. Hiermee konden we direct focussen op enkele sleutelprocessen, zonder daarbij overstelpt te worden door de zeer vele overige microbiële processen die in het wortelmilieu voorkomen. Hierbij zijn de volgende sleutelprocessen door ons het meest volledig onderzocht, waarbij we de verantwoordelijke genen, enzymen, de om te zetten stof en de geproduceerde stof hebben vastgesteld:

Proces	Gen	Enzym	Input	Output
Nitricifatie	amoA	ammonia mono oxygenase	ammoniak	nitraat
Afbraak pathogeen	chiiA	chitinase	chitine	meerdere stoffen
Afbraak signaalstof	aiiA	lactonase	AHL (lactones)	idem

Zie hiervoor ook de figuren 2.5 en 2.6 in het rapport. Het betreft dus een belangrijk proces in de plantenvoeding (stikstofvoorziening) en twee processen in de ziektevering. Daarnaast is de rol van de plant voor het microbioom, met name via de productie van wortellexudaten, bestudeerd. Deze processen zijn onderzocht door proeven waarbij we de aanvoer van de om te zetten stof, en abiotische omstandigheden, en activiteit en de uiteindelijke procesuitkomst hebben gevolgd middels frequente metingen in het substraat en aan de plant. De volgende bevindingen zijn uit het onderzoek naar voren gekomen:

Nitraat vanuit organische omzettingen

Planten hebben nitraat nodig en bij organische N bemesting zijn daarvoor microbiële omzettingen nodig die lopen via ammoniak. Ammoniak oxiderende bacteriën hebben voldoende organische voeding nodig: deze voeding was adequaat in de proef met veen in 2019 en bij de hogere toedieningen van organische meststoffen gebruik (Viscotec en EcoMix 4). Deze meststoffen bevatten beiden veel organisch N dat gemineraliseerd (tot ammoniak en nitriet, hetgeen deze bacteriën als energiebron nodig hebben) en genitrificeerd kan worden. In de proeven met steenwol en kokos substraat in 2020 en in 2021 waren er respectievelijk weinig en bijna geen nitrificerende bacteriën gevonden. Zo waren de hoeveelheden amoA veel lager (104-105 amoA kopieën/cm³ ten opzichte van 108-109 16S rDNA kopieën/cm³ aan totale bacteriën) dan in 2019 (ca. 10⁷ amoA kopieën/cm³ ten opzichte van 10⁹ kopieën 16S rDNA gen/cm³) en die nitrificeerders waren dus ook niet terug te zien in NGS (te lage relatieve aanwezigheid). Vermoedelijk leverde het substraat maar vooral de biovoeding nauwelijks de geschikte organische voeding.

Ziektewering tegen Fusarium

De volgende bevindingen bieden perspectief op een door sturing verhoogde ziekteverendheid maar behoeven nog meer onderzoek: de champost en chitine additieven vertraagden de infectie van *Fusarium* en zijn dus als zodanig ziekteverend. Maar het benodigde, effectieve toedieningsniveau voor de ziektevering tegen *Fusarium* is daarmee nog niet exact bekend. Uit de laatste proeven (in 2021) bleek dat 1 g chitine per week per plant en de lage concentratie champostthee (zie Methode voor uitleg over bereiding) de *Fusarium* infectie 2-3 weken kon vertragen. Desalniettemin vertraagde de infectie minder bij de hogere dosering van chitine en champostthee (wel iets, t.o.v. de controle), wellicht is een overmaat -mede door effecten op EC en zuurgraad- minder gunstig voor het microbiom.

Hiermee lijkt onze veronderstelling juist dat de chitine, puur of via champost – in vaste vorm of als thee extract – het microbiom stimuleert in hun afweer tegen *Fusarium*. Dit blijkt ook uit de hogere expressie van de *chiA*-genen en daaropvolgende enzymatische activiteit, terwijl dit niet gebeurt in substraat opgebouwd uit organisch materiaal zonder champost.

Ziektewering tegen Pythium

De gegeven *Pythium* besmetting had voor geen enkele plant fatale gevolgen, ondanks het significante besmettingsniveau en de vrij frequent voorkomende wortelschade. Niet duidelijk is of deze ziektevering daadwerkelijk komt door stimulerende werking van de additieven, aangezien symptomen niet gecorreleerd waren aan het type additief. Wellicht is ook *Pseudomonas* gestimuleerd, die antischimmel stoffen en antibiotica produceert. Ook de goede groeiomstandigheden voor de plant (licht, vocht, temperatuur, pH, anorganische voeding) hebben de wortels mogelijk weerbaarder gemaakt tegen het zwakte-pathogeen *Pythium*.

Rol van wortellexudaten

De exudaten van plantenwortels zijn een organische voedselbron voor het microbiom in de rhizosfeer, waardoor daar 100 tot 1000x meer micro-organismen voorkomen dan in de bulk grond. Mogelijk zal een sterke plant met veel exudaten zo ook de ziekteverende micro-organismen ondersteunen. Uit ons onderzoek blijkt dat ondersteuning met additieven extra helpt in ziektevering (biotoets met inbreng van inoculum). De hoeveelheid additief is weinig relevant, het is zaak de juiste specifieke voeding te geven zodat de ziekteverende microben een eerste groeistimulans krijgen. Voor verdere groei en kolonisatie van het wortelmilieu moeten die microben zich redden met wat het substraat biedt, waarin mogelijk ook de pathogene schimmels als chitine bron. Overleving in een nieuw biologisch evenwicht betekent dan hopelijk dat een stabiele ziektevering is ontstaan.

5.3 Conclusies

In deze studie was het na vier jaar aan substraatproeven met tomaat dan wel komkommer mogelijk enkele belangrijke microbiologische functies in kaart te brengen en deels te kwantificeren. Het betrof daarbij (a) nitrificatie als sleutelproces in stikstofomzetting, (b) chitineafbraak als belangrijk voorbeeld van de microbiële afbraak van schimmelpathogenen, en (c) lactonase activiteit als een microbiële actie om signaalstoffen van pathogenen af te breken.

Het bleek dat zowel aanwezigheid, via NGS, als aantallen, via qPCR, en het functioneren, via enzymmetingen en meting van het microbiële product, bijvoorbeeld nitraat, sterk afhankelijk was de aanwezigheid van de inputs, benodigd voor het microbiële proces. Dit is minder triviaal dan het klinkt, want een organisch substraat bevat vele, veelal complexe, organische stoffen die allen meer of minder geschikt zijn voor de microbiële functies die stimulering behoeven. Zo was in de eerste proef met toevoegingen van organische meststof Viscotec of Ecomix het aanbod van makkelijk afbreekbare organische N voldoende voor ammoniak- en vervolgens nitraatproductie, terwijl in de vervolgprouven bleek dat de hoeveelheid organische N zeer beperkend was voor het nitrificatieproces, ondanks toevoeging van champost of de aanwezigheid van kokos. Voor de chitineafbraak middels het enzym chitinase was het aanbod van chitine ook cruciaal, evenwel waren de resultaten voor de twee toedieningsniveaus niet geheel eenduidig. Toch bevestigden de proeven dat sturing van het gewenste microbiële proces met additieven in principe mogelijk is.

Champost- en chitinetoevoegingen bleken de infectie van *Fusarium* enkele weken te vertragen. Onze aanname is dat deze hulpstoffen de activiteit van functionele groepen die pathogenen schimmels afbreken hebben bevorderd. Dit kon ook afgeleid worden uit verhoging van de activiteit van het enzym chitinase. Een bio-toets gecombineerd met een proef met verschillende niveaus van additieven bleek hiervoor een goede onderzoekstool. Voor de bio-toets met *Pythium* is geen verband gevonden tussen de verschillende additieven en de mate van infectie.

De rekentool is geschikt om het effect van abiotische condities (zoals pH) op afbraak van organische stikstof te voorspellen. De tool is nog niet geheel praktijkrijp, en dient bij voorkeur eerst in het praktijksysteem proef te draaien en geijkt te worden door het volgen van chemische samenstelling van wortelmilieu en drain.

Literatuur

- Blaya, J., Marhuenda, F.C., Pascual, J.A., Ros, M. 2016. Microbiota Characterization of Compost Using Omics Approaches Opens New Perspectives for Phytophthora Root Rot Control. *PLoS ONE* 11(8): e0158048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158048>
- Blok, C., van Winkel, A., and Boedijn, A. (2022a). Inventarisatie van een mogelijke nieuwe bron voor koolzuurgas (CO₂). Inzet van oxidatieve bioreactoren voor gecombineerde productie van plantenvoeding en CO₂ uit organische restproducten. WPR-1160.
- Blok, C., Boedijn, A., M., S., Beerling, E., Meisner, A., and van der Salm, C. (2022b). Een inventarisatie van groeimedia anders dan bodem en hun mogelijkheden in relatie tot (plant)weerbaarheid. Kansen en knelpunten in de periode tot 2030. WPR-1170.
- Carrasco, J., Tello, M.L., de Toro, M., Tkacz, A., Poole, P., Pérez-Clavijo, M., Preston, G. 2019. Casing microbiome dynamics during button mushroom cultivation: implications for dry and wet bubble diseases. *Microbiology (Reading)*. 165(6):611-624. doi: 10.1099/mic.0.000792. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30994437.
- CEN 13041, 2011. Soil improvers and growing media – Determination of physical properties – Dry bulk density.
- CEN 13039, 2011. Soil improvers and growing media – Determination of organic matter and ash.
- CEN 13037, 2011). Soil improvers and growing media - Determination of pH.
- CEN 13038, 2011. Soil improvers and growing media - Determination of electrical conductivity.
- CEN 16087-1, 2011. Soil Improvers and Growing Media—Determination of the Aerobic Biological Activity— Part 1: Oxygen Uptake Rate (OUR).
- De Visser, Pieter, Blok, Chris, Barbara Eveleens-Clark, Gerdit Greve, Huei Ming Huisman, Nina Oud, en Marta Streminska, 2021. Wortelmilieu; proeven 2020. WPR rapport 1052, Bleiswijk.
- De Visser, Pieter, Nina Oud, Chris Blok, Marta Streminska, Gerdit Greve, Huei Ming Huisman, Khanh Pham, Aat van Winkel. 2020. Cv100 project Wortelmilieu: Voortgangsverslag wortelmediumproeven 2019. WPR rapport 938, Bleiswijk.
- De Visser, Pieter, W. Voogt, F.B.T. Assinck, M. Heinen, J. Postma, J.J. Amsing, G. Straatsma & L.F.M. Marcelis. 2006. Organische stofmanagement in biologische kasteelt: resultaten paprikaproef en modellering stikstofdynamiek. PRI-rapport 86, Wageningen.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B. 2005. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4117-4120; DOI: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005
- Grunert, O., Reheul, D., Van Labeke, M-C., Perneel, M., Hernandez-Sanabria, E., Vlaeminck, S. E., Boon, N. 2016a. Growing media constituents determine the microbial nitrogen conversions in organic growing media for horticulture. *Microbial Biotechnology* 9: 389– 399
- Grunert, O., Hernandez-Sanabria, E., Vilchez-Vargas, R. *et al.* 2016b. Mineral and organic growing media have distinct community structure, stability and functionality in soilless culture systems. *Sci Rep* 6: 18837 <https://doi.org/10.1038/srep18837>
- Montagne, V., Capioux, H., Barret, M. *et al.* 2017. Bacterial and fungal communities vary with the type of organic substrate: implications for biocontrol of soilless crops. *Environ Chem Lett* 15, 537–545 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0628-0>
- Rothauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.* 63(12):4704-12. doi: 10.1128/AEM.63.12.4704-4712.1997. PMID: 9406389; PMCID: PMC168793.
- Suzaki, K., Yoshida, K., Sawada, H. 2004. Detection of tumorigenic Agrobacterium strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J Gen Plant Pathol* 70, 342–347 (2004). <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0133-8>
- TKI. 2019. Projectvoorstel Wortelmilieu.
- Williamson, N., Brian, P., Wellington, E. 2000. Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinases in the environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 315–321 <https://doi.org/10.1023/A:1010225909148>

-
- Whitmore, A.P., H. Klein Gunnewiek, G.J. Crocker, J. Klír, M. Körschens & P.R. Poulton, 1997. Modelling the turnover of carbon in soil using the Verberne/MOTOR model. *Geoderma* 81: 137-151.
- Zhong, C., Peng, D., Ye, W., Chai, L., Qi, J., Yu, Z., Ruan, L., Sun, M. 2011. Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. *PloS one*, 6(1), e16025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016025>

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



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1263

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.600 medewerkers (6.700 fte) en 13.100 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers 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