



Microbieel gezond water

Parameters microbiologische waterkwaliteit en de relatie met productie en ziektedruk

Jolijn Bonnet¹, Jolanda Korteland¹, Teus Luijendijk¹, Jeroen Krosse⁴, Paul van der Wielen³, Kimberly Learbuch³, Luc Hornstra³, Anthony Verschoor³, André van der Wurff²

¹ Stichting Control in Food & Flowers

² Groen Agro Control

³ KWR Water Research Institute

⁴ WaterIQ



Samenvatting

Door de zuiveringsplicht is er in de sector veel aandacht voor emissie en hergebruik van waterstromen. Er is onderzocht hoe de selectieve zuivering van water bij kan dragen aan de teelt. Er wordt hierbij gestuurd op “goede” Micro Flora in water en wortelmilieu. Organische stof is belangrijk voor het gewas. De specifieke rol en de samenstelling ervan, met name in de kas, is nog grotendeels onbekend. Organische stof kan direct effect hebben op de plant, maar ook indirect op de rhizosfeer gemeenschap rondom de wortels. Er zijn op drie praktijkbedrijven, d.i. phalaenopsis, tomaat en snij-gerbera, metingen verricht om meer inzicht te krijgen in de microbiologie in de waterstromen. Fenolische zuren worden vooral aangetroffen op het bedrijf met phalaenopsis in de drain en na de waterbehandeling. Glucose wordt vooral aangetroffen in de teelt van gerbera. Fructose wordt vooral aangetroffen op het bedrijf met phalaenopsis en tomaat in april. Het organische stofgehalte is over het algemeen hoger in drain-, dan in aanvoerwater. De suikergehaltes zijn in het algemeen erg laag. De organische zuren zijn te laag om goed te meten. Van de fenolische zuren is benzoëzuur op naam gebracht, maar de grootste hoeveelheid fenolische zuren is onbekend. Fenolische zuren spelen een belangrijke rol in de geïnduceerde resistentie in o.a. komkommer en tomaat en zijn vaak fungitoxisch voor *Fusarium*. Er werden praktijkproeven ingezet met toediening van verschillende wortellexudaten tijdens de opkweek van tomaat. De behandelde tomaten lieten geen verschil in groei zien, hoewel in de teelt één van de behandelingen meer broeikoppen leek te hebben. In vervolgprouwen zijn andere wortellexudaten en ook fracties (organische stoffen uit teeltwater die op verschillende wijze opgezuiverd werden) getest in de opkweek van tomaat. Hier werden wel verschillen in een aantal groeiparameters gemeten. Ook is aan de helft van de planten *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) toegevoegd, om te kijken of bepaalde exudaten of fracties de weerbaarheid tegen deze pathogeen verhoogde. Dit was in groeiachterstand of symptomen van de plant niet te merken. FORL had een duidelijke effect op het microbiom rondom de wortels met toename van *Thermomonas*, en een afname *Pseudomonas* en *Acinetobacter*. Toevoeging van fracties uit de waterstromen en wortellexudaten in het algemeen resulteerde in een bufferende werking waardoor de soortensamenstelling rondom de wortel minder veranderde. De hoeveelheid toevoeging had een groter effect dan de identiteit van het organische stof.

Stichting Control in Food & Flowers

Distributieweg 1
2645 EG Delfgauw
T: +31(0) 15-2858124
E: info@stfoodandflowers.nl
KvK: 61916471

Auteur(s):	J. Bonnet, J. Korteland, T. Luijendijk, J. Krosse, P. van der Wielen, K. Learbuch, L. Hornstra, A. Verschoor, A. van der Wurff
Projectnummer:	2020 - 8534-19
Datum:	15-12-2020
Titel Rapport:	Microbieel gezond water
Opdrachtgever:	Plantum, St Programmafonds Glastuinbouw, Gewas coöperaties snij-Gerbera en Phalaenopsis.
Contactpersoon opdrachtgever:	Margreet Schoenmaker(Glastuinbouw Nederland)
Kernwoorden:	Water, recirculatie, waterkwaliteit, microbiologie, wortellexudaten, <i>Fusarium</i> .

De Stichting Control in Food & Flowers aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

Inhoud	pagina
1 Inleiding	5
1.1 Doel van het project.....	5
1.2 Aanleiding, doel en urgentie voor de sector	5
1.3 State of the art.....	6
1.3.1 Substraat	6
1.3.2 Micro Flora management	7
1.3.3 Wortelmilieu en sturen op microbiologie	7
1.3.4 Oplosbare organische stoffen	8
1.3.5 Nutriënten	8
1.3.6 Monitoring	9
2 Aanpak van het project.....	10
3 Resultaten praktijkonderzoek (KWR)	11
3.1 Materiaal en Methoden.....	11
3.1.1 Inventarisatie microbiologie en organische stof (praktijkmetingen)	11
3.1.2 Microbiologische analyse	13
3.1.3 Koloniegetal	13
3.1.4 Adenosinetrifosfaat	13
3.1.5 Biomassaproductiepotentie.....	14
3.2 Resultaten	14
3.2.1 Waterfase, koloniegetal	14
3.2.2 Waterfase, adenosinetrifosfaat	15
3.2.3 Wortelzone, KG22 en ATP.....	17
3.2.4 Biomassaproductiepotentie (BPP)	17
3.3 Discussie/conclusie	19
4 Resultaten praktijkonderzoek (SCFF/GAC).....	20
4.1 Praktijk analyse	20
4.1.1 Inleiding	20
4.1.2 Materiaal & Methode	20
4.1.3 Resultaten.....	20
4.1.4 Discussie en conclusie.....	26
4.2 Analyse organisch materiaal	27
4.2.1 Inleiding	27
4.2.2 Materiaal & Methode	27
4.2.3 Resultaten.....	28
4.2.4 Conclusie & discussie	32
4.3 Proef opkweek en teelt tomaat	33
4.3.1 Inleiding	33
4.3.2 Materiaal & Methode	34
4.4 Pilot Fusarium	36
4.4.1 Inleiding	36
4.4.2 Materiaal & Methode	37
4.4.3 Resultaten.....	37
4.5 Bio-assays.....	38
4.5.1 Inleiding	38
4.5.2 Materiaal & Methode	38
4.5.3 Resultaten.....	39
5 Invloed organisch stofdoseringen op de microbiologie rond tomatenplantwortels	
43	

5.1	Inleiding.....	43
5.2	Materiaal & Methode	44
5.2.1	Opzet proeven	44
5.3	Monstername en DNA-analyse	46
5.3.1	Monstername	46
5.3.2	DNA isolatie	47
5.3.3	PCR en sequentieanalyse van het 16S rRNA gen van bacteriën	47
5.4	Resultaten en discussie.....	48
5.4.1	Studie 1: dosering van organische stoffracties met verschillende molecuulgrootte.....	48
5.4.2	Experiment 1: Effect op de bacteriegemeenschap van dosering neutrale en zuurfractie van laagmoleculair organisch stof uit drip en drain van praktijklocatie.....	49
5.4.3	Experiment 2: effect doseringen organische stoffracties > 2 kDa en > 20 kDa op de bacteriegemeenschap.....	51
5.4.4	Studie 2: dosering van specifieke exudaten en OSL®.....	53
5.4.5	Vergelijking van NGS-resultaten bacteriepopulatie met andere resultaten	56
5.5	Conclusies en aanbevelingen.....	57
5.5.1	Conclusies	57
5.5.2	Aanbevelingen	58
6	Algemene conclusie	59
6.1	Praktijkmetingen	59
6.2	Organische stof typeren	60
6.3	Praktijk proeven opkweek.....	60
6.4	Bio-assays.....	61
6.5	Metagenomica rhizosfeer gemeenschap.....	61
7	Aanbevelingen.....	63
8	Dankwoord	64
9	Referenties	65

1 Inleiding

Door de zuiveringsplicht is er in de sector veel aandacht voor emissie en hergebruik van waterstromen. Gezuiverd water kan gerecicleerd worden om verlies van (organische) nutriënten en water te voorkomen. Belangrijk hierin is dat het water niet steriel wordt, gelet op de negatieve effecten op de teelt.

Ook is er aandacht voor een verminderde inzet van gewasbeschermingsmiddelen (weerbaar telen). Het beschikbare middelenpakket krimpt, en er komen minder nieuwe middelen beschikbaar. Chemische middelen kunnen een negatieve impact hebben op de weerbaarheid van het systeem en er is een toenemende vraag naar preventieve-, en “groene” methoden om ziekten en plagen te voorkomen.

Er wordt in dit project onderzocht hoe de selectieve zuivering van water bij kan dragen aan de teelt en voor een weerbaar systeem voor de sier-, en vruchtgroententeelt onder glas. Er wordt hierbij gekeken naar aanwezigheid en sturing op “goede” Micro Flora in water en wortelmilieu (rhizosfeer) en naar het gewas.

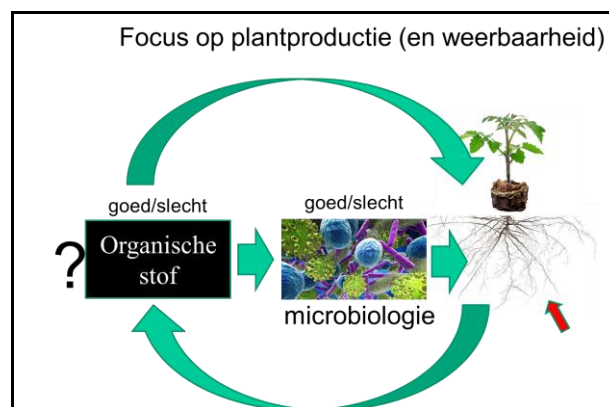
1.1 Doel van het project

Doel is van dit project is het in kaart brengen van de microbiologische teeltomstandigheden waarbij het water en nutriënten hergebruikt worden binnen het bedrijf. Ook wordt gekeken naar het effect op plantgroei en naar een teeltsysteem waarbij de inzet van gewasbeschermingsmiddelen en schade veroorzaakt door ziekten, voorkomen wordt.

1.2 Aanleiding, doel en urgentie voor de sector

Door de zuiveringsplicht is er in de sector veel aandacht voor emissie van waterstromen. De waterstroom die het bedrijf verlaat moet vrij zijn van gewasbeschermingsmiddelen en – in de verdere toekomst - van nutriënten. Deze kunnen verwijderd worden met behulp van waterzuiveringsinstallaties met een BZG goedkeuring. Waterzuivering kan plaats vinden met technieken als ozon en geavanceerde oxidatie, waarbij laatstgenoemde techniek meer mogelijkheden biedt voor een selectieve behandeling van water. Daarnaast kan gezuiverd water gerecicleerd worden om verlies van (organische) nutriënten en water te voorkomen. Belangrijk hierin is dat het water niet te steriel wordt, gelet op de negatieve effecten op de teelt zoals dat in de praktijk wordt gezien.

Ook is er in de sector veel aandacht voor een verminderde inzet van gewasbeschermingsmiddelen (weerbaar telen) en voor het tegengaan van schade door ziekten en plagen in de teelt en vooral in de opkweek. Het beschikbare middelenpakket krimpt, en er komen minder nieuwe middelen beschikbaar. Ook is er een toenemende bewust wording dat chemische middelen een negatieve impact kunnen hebben op de weerbaarheid van het systeem, zoals gebruik van middelen waarbij de planten verzwakt worden. Ook is er een toenemende vraag naar preventieve-, en “groene” methoden om ziekten en plagen te voorkomen.



Figuur 1. Schematische weergave van het onderzoeksdoel, namelijk het sturen met behulp van organische stoffen op de plant of op de plant via de microbiologie (rhizosfeer gemeenschap).

1.3 State of the art

Het watersysteem is op te delen in *i*) water in de opslag en aanvoer (schoonwater silo's, toevoerleidingen, druppelaars en andere watergeefsystemen), *ii*) water in het wortelmilieu (op en in de wortels, in het substraat), en *iii*) water in de afvoer, oftewel drainwater (goten, folies, vloeren, afvoerleidingen, vuilwater silo's). In de verschillende onderdelen van het watersysteem bevindt zich een grote diversiteit aan bacteriën, schimmels en virussen, mede dankzij de aanwezige planten-voedingsstoffen en organisch materiaal. Dit zogenaamde microbiom, dat verschilt per onderdeel van het watersysteem, kan afhankelijk van de samenstelling zowel positieve als negatieve effecten hebben op de ontwikkeling van de teelt. Het water in de aanvoer is doorgaans gedesinfecteerd (bijv. met UV, ozon, verhitting, peroxide, chloor). Micro-organismen die na desinfectie nog aanwezig zijn, kunnen in het watersysteem overleven en/of groeien en kunnen onder gunstige milieucondities een biofilm vormen in de leidingen van het irrigatiesysteem. Biofilm is een belangrijke oorzaak van verstoppingen van de druppelaars en vormt tevens een plek waar ziekteverwekkende bacteriën, schimmels en virussen zich kunnen vestigen en/of vermeerderen en is daarmee een infectiebron voor de teelt. De veelvuldig gebruikte desinfectiemiddelen die ingezet worden om biofilm te verwijderen, zorgen voor selectiedruk op het microbiom in het wortelmilieu, waardoor ziekteverwekkers ruimte krijgen om zich te vermeerderen. Het microbiom in het wortelmilieu wordt daarnaast beïnvloed door de directe omgeving, waaronder het substraat, de waterkwaliteit, aanwezige voedingsstoffen, wortellexudaten. Deze variabelen hebben daarmee niet alleen direct maar ook indirect, via de relatie met het microbiom, een belangrijke rol bij de plantengroei, en dus productie en kwaliteit.

Het is in algemene zin nog niet mogelijk om de microbiële waterkwaliteit voldoende effectief te monitoren om het microbiom naar wens te sturen. Hierdoor wordt de doorontwikkeling naar emissie loze tuinbouw geremd. Voor duurzame, emissie loze productiesystemen is kennis over microbiële monitoring en sturing cruciaal.

1.3.1 Substraat

Niet-oplosbare organische stof (*particulate organic matter*, POM) in het substraat is belangrijk voor het bepalen van de aanwezige microbiologie. Daarnaast is de samenstelling van het substraat door de identiteit van de organische stoffen, nutriënten, porievolume en mate van drainage bepalend voor het type microbiologie. Kokos is als substraat rijk aan bodemleven. Naar verwachting is dat voor bark ook zo. Dit geldt zowel voor bacteriën en schimmels, als voor protozoën en de aaltjes. Kokos wordt sneller gekoloniseerd door schimmels. Evenzo vertoont de microbiologie rond de wortel van een tomatengewas op steenwol meer overeenkomsten met dat van een paprika of komkommengewas op steenwol dan met dat van een tomatengewas op kokos. Steenwol is wel rijk aan bacterieleven maar de hoeveelheid schimmelbiomassa blijft bij steenwol achter ten opzichte van kokos. Ook de aantallen protozoën en aaltjes zijn bij steenwol lager dan bij kokos. Kasgrond is vooral lager in totale schimmelbiomassa (Van der Wurff et al. 2011). De aanwezigheid van kokos kan een verhoogde weerbaarheid tegen *Fusarium* geven door een specifieke microbiologie dat op kokos aanwezig kan zijn (Hyder e.a. 2009).

Daarnaast is de samenstelling van het substraat door de identiteit van de organische stoffen, nutriënten, porievolume en mate van drainage bepalend voor het type microbiologie. Kokos is als substraat rijk aan bodemleven. Naar verwachting is dat voor bark ook zo. Dit geldt zowel voor bacteriën en schimmels, als voor protozoën en de aaltjes. Kokos wordt sneller gekoloniseerd door schimmels.

Niet-oplosbare organische stof (*particulate organic matter*, POM) in het substraat is ook belangrijk voor het bepalen van de aanwezige microbiologie. Wu et al. (2007) lieten zien dat bijvoorbeeld bladafval van verschillende bomen een sterk effect had op de samenstelling van de aquatische microgemeenschap, zoals door het blad van de hazelnoot.

1.3.2 *Micro Flora management*

De basis voor het sturen op Micro Flora is enerzijds de mouterij (*cf.* Water IQ) en anderzijds de microbiologie van planten. In de mouterij wordt gerst gekiemd als uitgangsmateriaal voor bier. Ook in de mouterij traden problemen met *Fusarium* op. De *Fusarium* schimmel produceert namelijk giftige stoffen (mycotoxinen) die een probleem vormen voor de consumptie van bier. Om schimmels en *Fusarium* tegen te gaan wordt een organische stof toegevoegd en actief gestuurd op zuurstof en zuurgraad voor een effectieve Micro Flora. In de microbiologie van de teelt wordt gekeken naar de microbiologie die aanwezig is rondom de wortels. Deze microbiologie wordt actief bepaald door het type plant met behulp van het uitscheiden van organische moleculen (wortelexudaten). Er ontstaat een samenwerking tussen de microbiologie rondom de wortels (rhizosfeerbacteriën en -schimmels) en de plant. De plant levert voeding in de vorm van de wortelexudaten en de bacteriën leveren bescherming of hulp bij het opnemen van voeding, zoals kleine organische moleculen en mineralen voor de plant (Van der Wurff et al. 2011, 2013).

De hoeveelheid en soort organische stof in een systeem bepaalt in grote mate de samenstelling en de van de microbiologische gemeenschap in de waterstromen op het bedrijf. Deze organische stof wordt uitgescheiden door plantenwortels, is opgelost in water en wordt aangeduid als DOC (*dissolved organic carbon*). DOC is de voedingsbron voor bacteriën, en daarmee de belangrijkste bepalende factor voor het microbioom. De hoeveelheid en samenstelling van het DOC is bepalend voor de concentratie en soortenvariëteit van bacteriën, en daarmee een zeer belangrijke sturende parameter voor de microbiologische waterkwaliteit.

Door het reguleren van het DOC, hetzij door de concentratie te verlagen of te verhogen, hetzij door de samenstelling te veranderen (laagmoleculair versus hoog moleculair, of gemakkelijk afbreekbaar versus moeilijk afbreekbaar), kan de microbiële waterkwaliteit worden gereguleerd. Het reguleren van DOC is een toepassing die gemakkelijk in een teeltsysteem kan worden ingepast, waardoor kennis op dit gebied direct kan leiden tot succesvolle aanpassingen bij substraatteelt en teelt op water.

1.3.3 *Wortelmilieu en sturen op microbiologie*

Planten bepalen de lokale microbiologie (rhizobacteriën) om de wortels door o.a. de exudaten die zij via de wortels uitscheiden (Mazurier et al. 2009). De basis voor deze exudaten is de opslag van koolstof uit de bovengrondse fotosynthese. Maar liefst tot twintig procent koolstof die verkregen wordt via fotosynthese kan worden uitgescheiden door wortels in de vorm van wortelexudaten. Wortelexudaten zijn o.a. vetzuren, suikers en eiwitten. Deze wortelexudaten worden in het wortelmilieu bijna meteen omgezet. Ook schadelijke organismen maken hiervan gebruik, zoals *Fusarium solani*. *F. solani* staat wereldwijd in de top drie van schimmels met de meeste economische schade.

Planten bepalen in grote mate de rhizosfeer gemeenschap rondom de wortels. De microbiologie wordt aangetrokken door zgn. wortelexudaten. Omdat de bodem in het algemeen beschouwd wordt als voedingsarm (*cf.* Berendsen et al. 2018) is er vaak meer activiteit rondom der wortels. Ondanks dat er een grotere hoeveelheid microben aanwezig is rondom de wortels, is de biodiversiteit vaak kleiner in vergelijking met de bodem. De koolstof komt als wortelexudaten uit de wortels, zowel als organische-, als niet-organische verbindingen zoals bijvoorbeeld HCO_3 . De organische verbindingen zijn meer divers en hebben de meeste impact op de rhizosfeer (Jones, et al. 2009). Er wordt in de literatuur onderscheid gemaakt tussen actief en passief uitgescheiden exudaten, dit wordt respectievelijk secretie en diffusie genoemd. Deze kleine organische verbindingen zijn voornamelijk aminozuren, organische zuren en suikers en fenolische verbindingen. De grotere verbindingen zijn de polysacchariden (lange koolstof ketens) en eiwitten (mucus, cellulose) en deze zijn vaak moeilijker afbreekbaar. De grotere verbindingen vormen het grootste, maar minder diverse, bestanddeel van de wortelexudaten.

De rhizosfeer wordt wel gezien als de laatste verdedigingslinie tegen bodem pathogenen (Xing-Feng Huang et al. 2014). Ook kan microbiologie in de rhizosfeer een rol spelen in een verbeterde opname van nutriënten. Deze microbiologie wordt in de wetenschappelijke

literatuur aangegeven als *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR, Kloepper and Schroth 1978). PGPR worden uit de rhizosfeer gehaald om vervolgens te vercommercialiseren (Santhanam et al. 2015). Bekende voorbeelden zijn: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Gliocladium* en Actinomyceten *s.l.*

Organische verbindingen waarvan bekend is dat ze PGPR aantrekken zijn fenolen (Khoddami et al. 2014), organische of fenolzuren zoals kinazuur, melkzuur, appelzuur in combinatie met fructose of glucose voor de stikstof die microben nodig hebben (Shengjing Shi et al. 2011), coumarinezuur in komkommer (hoewel deze ook gelinkt wordt met toename van *Fusarium*) en vanillinezuur heeft een sterk effect op de samenstelling van de gemeenschap rondom de wortels.

Wortelexudaten zoals vetzuren kunnen ook geproduceerd worden door de wortels na blootstelling aan humuszuren (Silva Lima et al. 2014). Humuszuren en fulvinezuren kunnen groeihormoonachtige (auxine) stoffen bevatten (Canellas et al. 2015, Ferro et al. 2006). Er wordt in de literatuur meer melding gemaakt van positieve effecten op planten door humuszuren dan fulvinezuren (Lulakis & Petsas 1995). Organische stof in bodems kan voor 60% aan humuszuren bevatten (Zahid Hussain Shah et al. 2018). Er is weinig bekend over de identiteit van organische stof, en daarom worden stoffen benoemd op basis van het gedrag van verbindingen in een analyse. Bijvoorbeeld, de identificatie van humine-, humus- en fulvinezuren is gebaseerd op verschillende oplosbaarheid bij zure- en basische omstandigheden (Trevisan et al. 2010). Fenolische zuren en humuszuren resulteren in een toename van de zuurgraad van een bodem en dit zou indirect kunnen bijdragen aan een afname van plant-pathogene *Fusarium* in het systeem. Dit werd gezien in het onderzoek van *cf. Jaiswal et al. (2017)* in onderzoek naar effecten van biochar.

Silicium in potroos gaf, als de plant werd aangevallen door meeldauw, een toename van fenolzuren en rutine in de plant (Shetty et al. 2007).

Van diverse wortellexudaten is bekend dat ze invloed hebben op de rhizosfeer gemeenschap rondom de wortels. Zo heeft appelzuur in *Arabidopsis* een positieve werking op *B. subtilis* (Rudrappa et al. 2008) en DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one) in jonge granen heeft een beschermende werking maar *Pseudomonas putida* is hier goed tegen bestand en kan de plant beschermen tegen *A. tumefaciens tuma* (Neal et al. 2012). Ook kunnen wortellexudaten zoals vanillezuur acid, fumarazuur en coumarinezuur de productie van het antibioticum 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) stimuleren in *P. fluorescens* voor bescherming tegen *Pythium* (Barret et al. 2009)

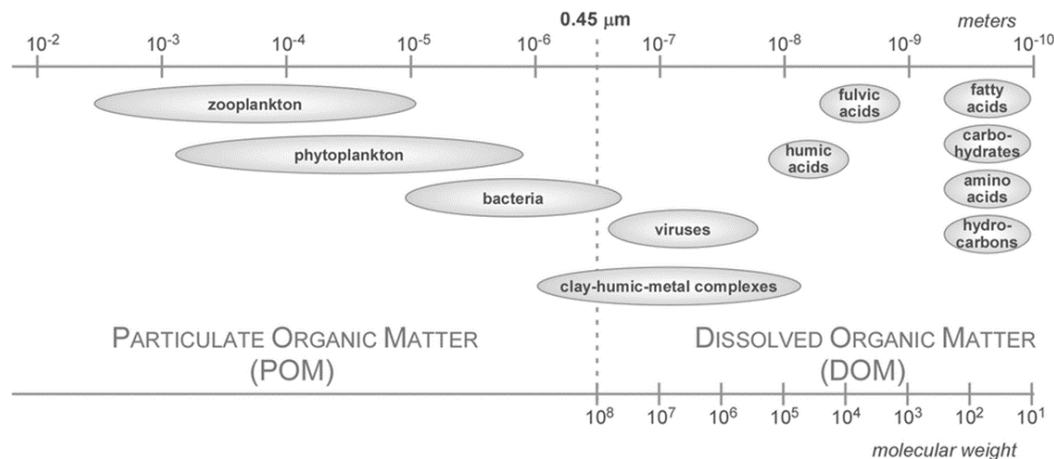
1.3.4 Oplosbare organische stoffen

Organische stof bepaalt de samenstelling van de microbiologische gemeenschap in de waterstromen op het bedrijf. Deze groep aan organische stof die opgelost is in water wordt aangeduid als DOM (dissolved organic matter) en bestaat uit kleine moleculen. De samenstelling van het DOM bepaalt de aanwezigheid van Gammaproteobacteria, *Roseobacter* of (SAR11 groep) Alphaproteobacteria. Deze reageren namelijk erg snel op deze stoffen. In de natuur is de samenstelling afhankelijk van de locatie/ecosysteem en het seizoen. Binnen de waterstroom van een glastuinbouw bedrijf zijn de omgevingsfactoren minder sterk verschillend, maar zal verschillen tussen de watermassa's in bv. het bassin, het substraat, de teeltgoten en voor-, en na zuivering e/o ontsmetting. Vaak vindt bij zuivering een filtratie plaats, waardoor kleine stoffen (DOM) vrij doorgang vinden en de grotere deeltjes (POM) weg gefilterd wordt (zie ook Figuur 1). Daarnaast laat divers onderzoek zien dat vers versus oud DOM (Amon and Benner 1996) en labiel versus stabiel DOM een invloed kan hebben op de soortensamenstelling.

1.3.5 Nutriënten

Naast de organische stoffen is de microbiologische gemeenschap ook afhankelijk van anorganische nutriënten (Teira et al. 2010). De hoeveelheid nutriënten heeft niet veel invloed op de structuur van de gemeenschap, behalve als er sprake is van erg weinig (oligotroof) versus erg veel nutriënten (eutroof). Alphaproteobacteria domineren in oligotrofe situaties (Eiler e.a. 2003) Een bekend voorbeeld is *Rhizobium rhizogenes*, de veroorzaker van

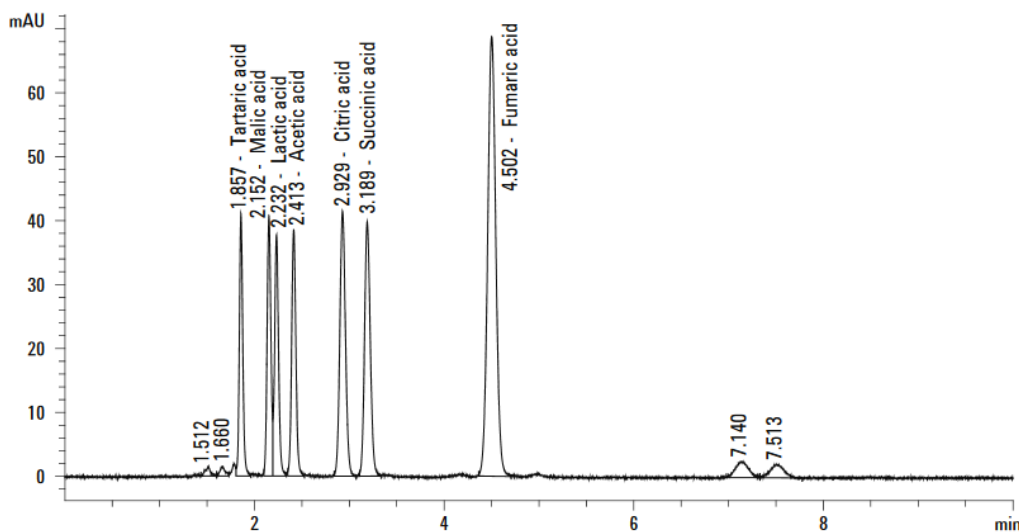
overmatige wortelgroei in vruchtgroenten onder glas. Tenslotte heeft recent onderzoek laten zien dat het gebruik van zgn. *controlled released fertilizers* leidt tot lagere EC waarden, wat mogelijk een gunstig effect heeft op de niet-pathogene micro-organismen.



Figuur 2. Overzicht van organische stoffen opgelost in irrigatiewater. Moleculair gewicht van de opgeloste fractie (DOM) is 10^1 - 10^8 da en van kleine deeltjes (POM) is $>10^8$. Kleinste deeltjes zijn vetzuren, aminozuren, eenvoudige koolhydraten (suikers), koolwaterstoffen, fulvine-, en humuszuren. Opticlear Diamond (WaterIQ) laat de fracties tot $0.5 \mu\text{m}$ door. *Fusarium macroconidia* zijn $27\text{-}52 \times 4.4\text{-}6.8 \mu\text{m}$ en *microconidia* zijn $8\text{-}16 \times 2\text{-}4 \mu\text{m}$.

1.3.6 Monitoring

Bij gebruik van duurzame technieken is monitoring van de microbiologische waterkwaliteit essentieel om tijdig te kunnen ingrijpen. Helaas is op dit moment geen eenduidige parameter voorhanden die als monitoring van de waterkwaliteit kan dienen. WaterIQ heeft een eerste versie ontwikkeld (Micro Flora dash-board) waarbij gekeken wordt naar de hoeveelheid bacteriën en schimmels in het teeltsysteem. Dit kan als een basis worden gezien voor *fine-tuning* waarbij binnen dit project onderscheid gemaakt gaat worden tussen slechte-, en goede groepen schimmels en bacteriën. Het inzetten van DNA-technieken 'Next Generation Sequencing' helpt bij het vinden van bacteriën en schimmels die kunnen worden gerelateerd aan een verslechterende waterkwaliteit, en daarmee mogelijk een goede indicator kunnen zijn. Daarnaast is de organische stof hoeveelheid en samenstelling ook een belangrijke indicator.

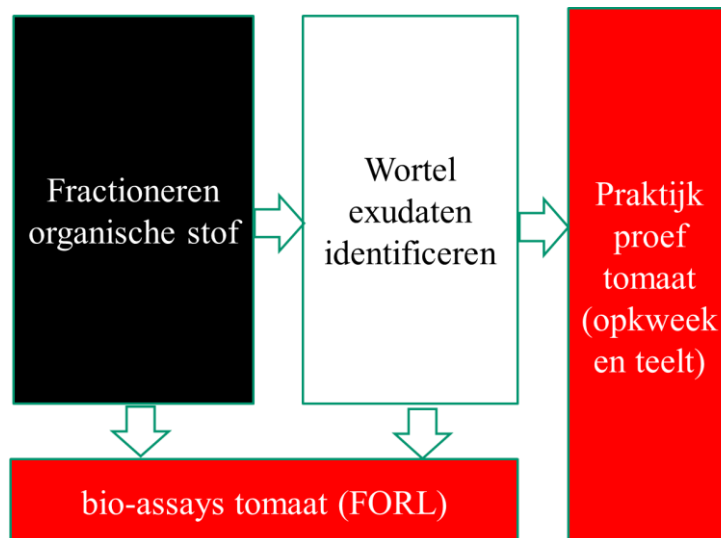


Figuur 3. Detectie van organische zuren met behulp van een Agilent 100 HPLC-DAD ZORBAX SB Aq kolom (From: Straten & Claessen Agilent note Analysis of Organic Acids in Aqueous Samples).

2 Aanpak van het project

De aanpak van het project is als volgt opgebouwd:

- Monitoring van bassinwater en drainwater bij teler(s) op locatie op voor het microbiom belangrijke parameters zoals organische stof, temperatuur, zuurstof.
- Samenstelling vaststellen van bacteriepopulaties die aanwezig zijn in het systeem, waarbij naast water ook de biofilm wordt bemonsterd. De bacteriesamenstelling wordt bepaald door microbiële profilering met behulp van *Next Generation Sequencing*.
- Vaststellen wat de rol is van organische stoffen (gemakkelijk afbreekbaar of geleidelijk afbreekbaar) die door de plantenwortels worden uitgescheiden op de microflora en het behouden van de natuurlijke microbiom.
- Monitoring van pathogene micro-organismen gedurende een teelt waarbij zowel water als biofilm wordt onderzocht.
- In een proefopstelling worden planten blootgesteld aan groeicondities met organische stof samenstelling en concentraties waarvan wordt verwacht dat deze juist een slechte invloed hebben op het microbiom, zodat wordt vastgesteld welke organische stof samenstelling en concentratie moeten worden vermeden. Indien mogelijk zullen planten daarbij ook worden blootgesteld aan pathogene micro-organismen.



Figuur 4. Schematisch overzicht van aanpak van het project waarbij organische stof in het water op praktijkbedrijven (*phalaenopsis*, *snij-gerbera* en tomaat) wordt gefractioniseerd en eventuele bekende wortel exudaten worden geïdentificeerd aan de hand van analyse pakketten. Vervolgens worden er proeven uitgevoerd met tomaten plantjes in opkweek waarbij gekeken wordt naar groei en weerbaarheid tegen *Fusarium* (FORL) en de identiteit van de rhizosfeer gemeenschap.

3 Resultaten praktijkonderzoek (KWR)

Auteur: Anthony Verschoor

3.1 Materiaal en Methoden

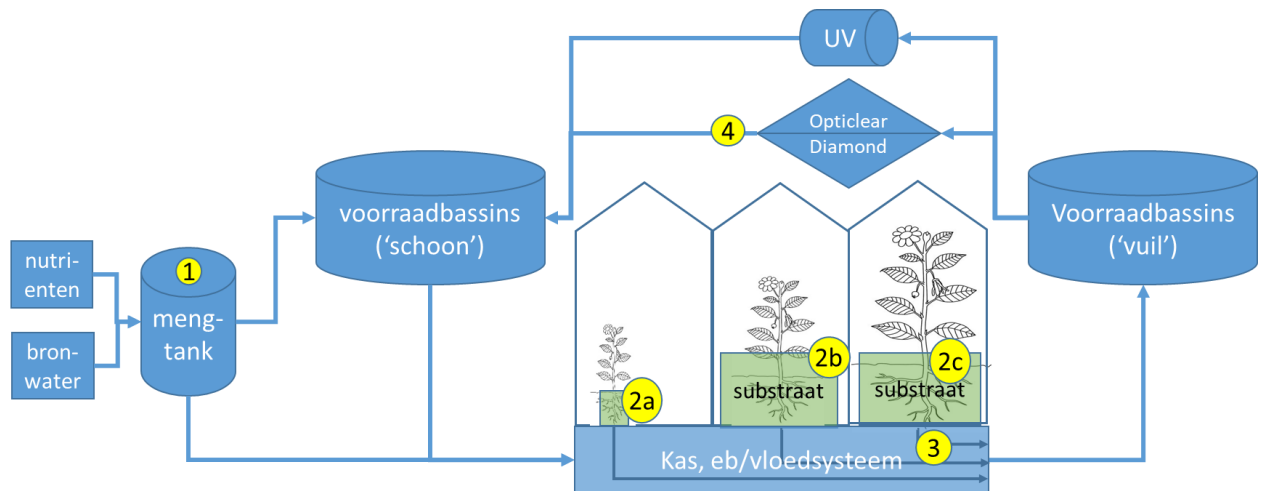
3.1.1 Inventarisatie microbiologie en organische stof (praktijkmetingen)

Bij het onderdeel inventarisatie microbiologie is in eerste instantie de waterstroom binnen het bedrijf (met desinfectie/waterbehandeling) in kaart gebracht. Op verschillende punten in de waterstroom zijn monsters genomen en geanalyseerd op organische-stofgehalte en microbiologische parameters. Dit moet gezien worden als een soort nulmeting, omdat er nog zeer weinig kennis is op dit gebied. Er is bemonsterd bij vier verschillende teeltsystemen: tomatenopkweek, tomatenteelt, gerbera en potorchidee. De verwachting is dat deze teeltsystemen ieder eigen specifieke kenmerken hebben, maar dat er mogelijk ook overlap kan bestaan in de uitkomsten. Hiermee kan de kennis gebruikt worden voor de hele glastuinbouwsector.

In figuur 5 staat het processchema met de waterstromen door de kas schematisch weergegeven voor tomatenopkweek: het water voor de planten wordt bereid uit eigen bronwater en nutriënten (meststoffen en overige toevoegingen). Dit wordt in een mengtank aangemaakt waarna het in voorraadbassins voor 'schoon' water terechtkomt. Vanuit deze bassins gaat het water naar de planten in de kas. Bij tomatenopkweek betreft dit drie stadia (zaailingen, oppot en afkweek); bij de andere gewassen is dit één fase. Het overtollige water uit de kas wordt opgevangen via een goot en gaat naar de voorraadbassins voor 'vuil' water. Dit water wordt behandeld met de Opticlear Diamond of UV, waarna het weer naar de voorraadbassins gaat. Op verschillende punten in het systeem zijn monsters genomen voor een inventarisatie van de organische stof en microbiologie (onderstreept); in de wortelzone van de planten zijn alleen monsters genomen voor de microbiologie:

1. Aanmaak voedingswater: bemonstering water via mangatdeksel (Figuur 6, links);
2. Wortelzone:
 - a. Zaailingen;
 - b. Oppotkweek;
 - c. Afkweek;
3. Drainwater. Bij het eb-en vloedsysteem van tomatenopkweek wordt water bemonsterd uit de vloerput (Figuur 6, rechts).
4. Monsterpunt na Opticlear Diamond (OCD).

Figuur 5. Schematische weergave waterstromen (tomatenopkweek), inclusief monsterpunten



Figuur 6. Links: mengtank met mangatdeksel aan bovenzijde. Rechts: vloerput bij eb- en vloedsysteem van de afkweek. Tevens zijn hier de planten in substraatblokken te zien.



Bij het opkweek bedrijf voor tomaat is één bemonstering uitgevoerd als nulmeting voor de planten die later in de tomatenteelt terecht zouden komen. Daarnaast is met enige regelmaat bemonsterd bij de tomatenteelt, bij potorchidee en snij-gerbera. In Tabel 1 is een overzicht te zien van de data waarop bemonsterd is bij de verschillende bedrijven.

Tabel 1. *Monsterdata bij de verschillende bedrijven*

datum	tomaat, opkweek	tomaat,teelt	potorchidee	gerbera
3-10-2018	X			
19-11-2018		X		
26-11-2018			X	
12-12-2018		X		
21-1-2019			x	
28-1-2019				X
18-2-2019			X	
8-4-2019		X	X	
13-5-2019			X	
24-6-2019		X		
26-8-2019		X		X

3.1.2 Microbiologische analyse

De microbiologische activiteit in het watersysteem is geanalyseerd aan de hand van verschillende parameters:

- Het kiemgetal bepaald bij 22°C (KG22) is een maat voor het totale gehalte micro-organismen.
- Het gehalte adenosinetrifosfaat (ATP) is een directe maat voor de totale microbiologische activiteit.
- BPP (biomassaproductiepotentie): een methode om de hoeveelheid organische stoffen die door micro-organismen kan worden gebruikt voor groei te bepalen. Bij de BPP-test worden twee maten gehanteerd:
 - het maximaal behaalde ATP-gehalte binnen een week (BP7).
 - de cumulatieve ATP-productie over twee weken (BPC14).

3.1.3 Koloniegetal

Het koloniegetal is bedoeld om het aantal kolonievormende micro-organismen te bepalen in watermonsters. Bij deze kweekmethode komt slechts een gedeelte van de in het water aanwezige kiemen tot kolonievorming. Het koloniegetal bij 22°C (KG22) is een maat voor het aantal micro-organismen dat in staat is te groeien op glucosegistextractagar-medium. KG22 is bepaald volgens KWR Huisvoorschrift LMB-032, gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 6222. Hierbij is in duplo 1 ml van het monster in een petrischaal gebracht waarna het gemengd werd met een vloeibare voedingsbodem. Nadat de voedingsbodem gestold was, is deze geïncubeerd bij 22C. Na 3 dagen zijn alle hierop ontstane kolonies geteld.

3.1.4 Adenosinetrifosfaat

ATP is een energiedrager die aanwezig is in alle levende organismen. ATP wordt in de cel gevormd bij de oxidatie van energiebronnen en vervolgens weer gebruikt bij de synthese van nieuw celmateriaal. De ATP bepaling berust op de luciferine-luciferase reactie, waarbij ATP onder vorming van licht (een foton per molecuul ATP) overgaat in adenosinedifosfaat (ADP). Met behulp van lichtgevoelige apparatuur kan de lichtproductie nauwkeurig worden gemeten. De werkwijze levert binnen enkele minuten een resultaat op. De detectiegrens van de bepaling bij direct onderzoek van drinkwater bedraagt ca. 1 ng ATP l-1. Op basis van gemiddelde waarden voor het ATP-gehalte per bacteriecel kan met het ATP-gehalte een schatting worden gemaakt van de concentratie aan actieve (levende) bacteriën. Elke

bacteriële cel bevat ca $5 \cdot 10^{-15}$ gram ATP. De ATP-bepaling wordt gebruikt voor de bepaling van de biomassaconcentratie in leidingwater en in biofilms en in testen voor de bepaling van de biologische (in)stabiliteit van water en de groeibevorderende eigenschappen van materialen in contact met leidingwater. Analyses van adenosinetriphosfaat (ATP) zijn uitgevoerd volgens KWR huisvoorschrift LMB-002, gelijkwaardig aan NEN-EN 16421:2014. Dit is gedaan na enzymatische reactie (luciferine, luciferase) in een zeer gevoelige fotometer (Celsis Advance luminometer), waarbij onderscheid gemaakt is tussen celgebonden en vrij ATP.

3.1.5 Biomassaproductiepotentie

Door de biomassaproductiepotentie (BPP) van water te bepalen, aan de hand van ATP metingen in de tijd door de groei van in het water van nature voorkomende micro-organismen, wordt een indruk verkregen over de "nagroeipotentie" van dat (drink)water. Uit het verloop van het ATP-gehalte in de tijd worden twee parameters afgeleid. De eerste is de maximale ATP-concentratie gedurende de eerste zeven dagen van de incubatieperiode (BP7) en de tweede parameter is de cumulatieve ATP-opbrengst in 14 dagen (BPC14). De BP7 geeft informatie over de hoeveelheid gemakkelijk afbreekbare verbindingen die door micro-organismen in het water kunnen worden benut. Des te hoger deze parameter is des te hoger de hoeveelheid gemakkelijk afbreekbare stoffen die in het water aanwezig zijn. De BPC14 geeft informatie over de totale hoeveelheid afbreekbare stoffen (zowel gemakkelijk als moeilijk afbreekbare verbindingen voor micro-organismen) in het water en des te hoger de BPC14 des te meer afbreekbare stoffen in het water aanwezig zijn. De BPP-test is uitgevoerd volgens KWR Huisvoorschrift LMB-012. De BPP werd bepaald door een erlenmeyer te vullen met 600 ml van het te onderzoeken water, waaraan vervolgens fosfaat en nitraat werden toegevoegd. Bij sommige teelten werd ook sulfiet toegevoegd om eventueel waterstofperoxideresidu te neutraliseren, en een actief-koolfilteraatent omdat de van nature aanwezige microbiële gemeenschap hierdoor afgedood kan zijn. De kolven werden vervolgens 14 dagen geïncubeerd bij 25°C. Tijdens de incubatie periode werd op dag 0, 1, 2, 4, 7, 9, 11 en 14 monsters genomen van de kolven en werd het totale ATP-gehalte gemeten als maat voor actieve biomassa. Met deze gegevens werden vervolgens de BP7 en de BPC14 berekend.

3.2 Resultaten

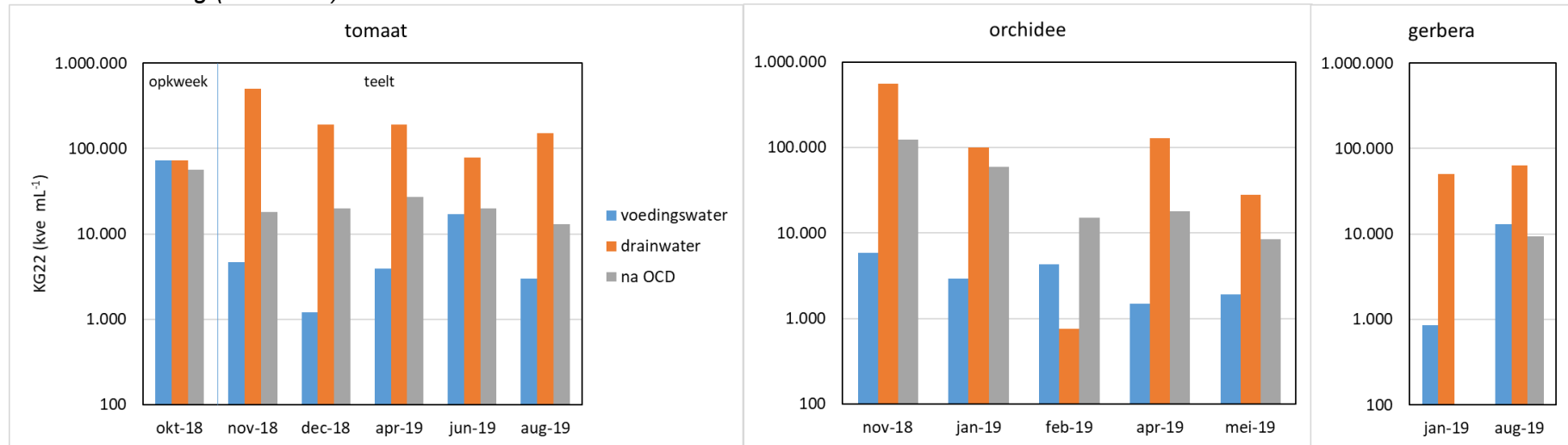
3.2.1 Waterfase, koloniegetal

In figuur 7 staan de resultaten weergegeven voor KG22 voor de watermonsters genomen uit de verschillende systemen. De teeltsystemen laten allemaal hetzelfde patroon zien voor KG22, dat ook in de tijd stabiel blijft: een lage KG22 in het voedingswater, gevolgd door een forse toename van KG22 in het drainwater, en weer een wat lagere KG22 na waterbehandeling ("na OCD"). De hoogste KG22-waarden worden gevonden in drainwater van tomatenteelt en potorchidee, en bij beide systemen zijn de hoogste waarden aan het begin van de meetperiode (november) gevonden. Dit patroon is ook wat verwacht wordt voor dit soort systemen (zie ook figuur 7): bij het maken van het voedingswater wordt gebruik gemaakt van redelijk schone bronnen: al dan niet behandeld grond- en/of regenwater en behandeld drainwater, waaraan nutriënten worden toegevoegd. Na passage door het teeltsysteem neemt het kiemgetal toe door instroom van micro-organismen, nutriënten en organische stoffen en door microbiële groei in het water zelf. Waterbehandeling zal de dichtheid van micro-organismen doen afnemen, maar door de verrijking van het water met nutriënten, organische stof en micro-organismen uit het teeltsysteem zal dit niet meer teruggaan naar het relatief schone uitgangswater. Een opvallende uitzondering op dit patroon is de tomatenopkweek (oktober 2018), waar de KG22-waarden vrijwel hetzelfde zijn door het hele watersysteem. Dit suggereert een snelle en volledige waterkringloop met een weinig effectieve waterbehandeling. Dit kan bijvoorbeeld voorkomen wanneer de waterbehandeling op het moment van bemonsteren (tijdelijk) buiten bedrijf is.

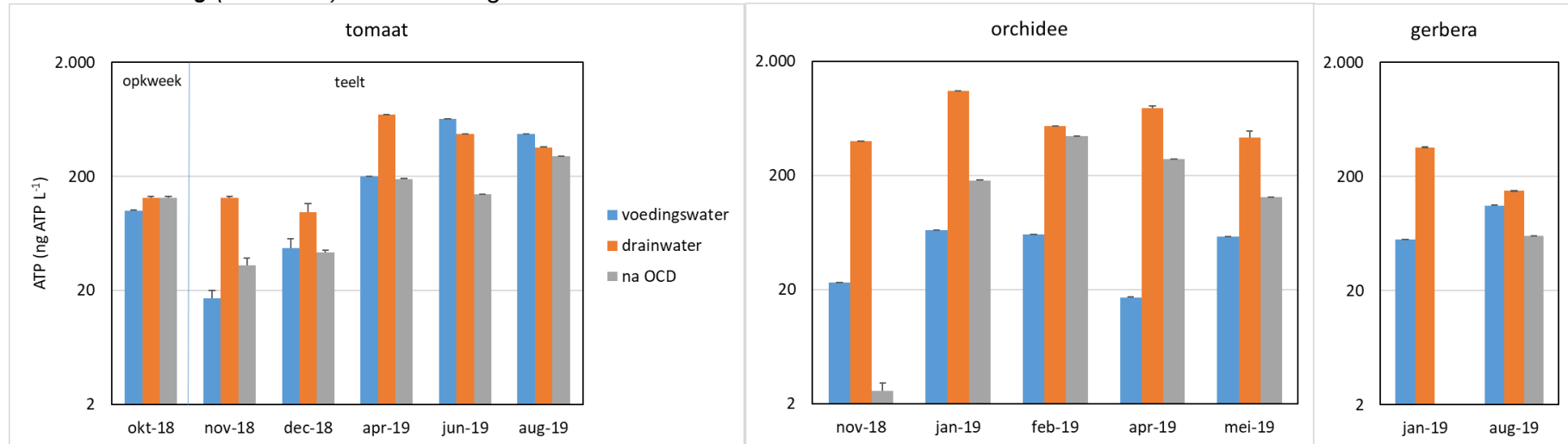
3.2.2 *Waterfase, adenosinetrifosfaat*

Ook voor het ATP-gehalte is een vergelijkbaar patroon te zien als voor KG22: het laagst in het voedingswater, hoogst in het drainwater en weer lager na waterbehandeling (Fig. 8). Om dezelfde redenen als bij KG22 is dit ook geen verrassend patroon, hoewel benadrukt dient te worden dat ATP een directere maat is voor de biologische activiteit, en KG22 voor de cellen die op dat moment aanwezig zijn (en bij 22°C op de gekozen voedingsbodem kunnen uitgroeien). Ook bij het ATP-gehalte zijn de waardes opvallend gelijk voor alle onderdelen van het watersysteem bij de tomatenopkweek (oktober 2018). Verder is een opvallend lage KG22-waarde gevonden in het behandelde water van potorchideeën in november 2018, wat waarschijnlijk te maken heeft met de timing en dosering van waterstofperoxide in het systeem: op het moment van monsternamen was dit waarschijnlijk vrij hoog, wat een direct effect heeft op het ATP-gehalte.

Figuur 7. KG22 van watermonsters uit de verschillende systemen. Links: tomaat (opkweek en teelt); midden: phalaenopsis; rechts: snij-gerbera. Watermonsters zijn genomen in het voedingswater, drainwater en na waterbehandeling ("na OCD").



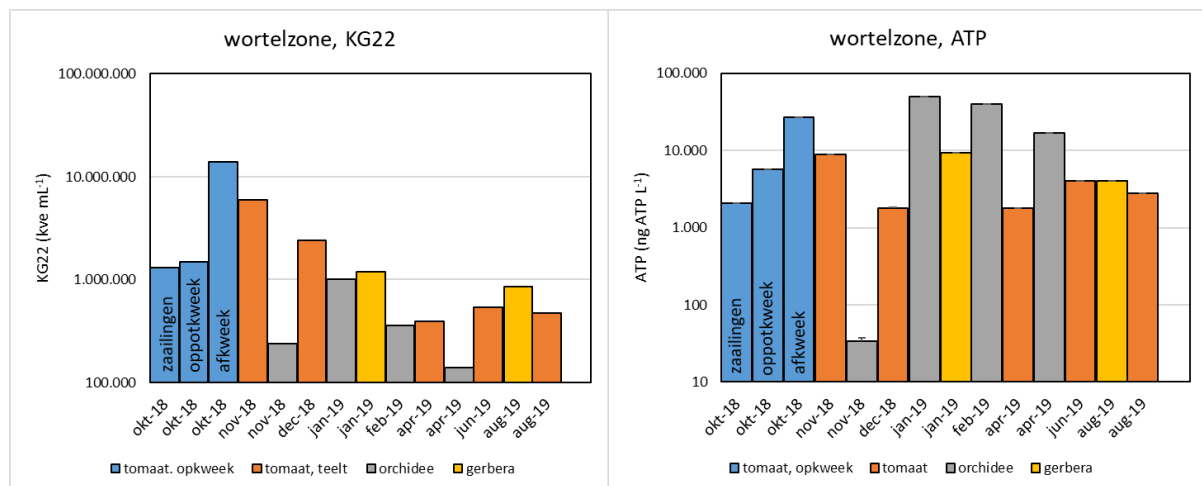
Figuur 8. Totaal ATP-gehalte van watermonsters uit de verschillende systemen. Links: tomaat (opkweek en teelt); midden: orchidee; rechts: gerbera. Watermonsters zijn genomen in het voedingswater, drainwater en na waterbehandeling ("na OCD"). Foutbalken geven standaarddeviatie aan.



3.2.3 Wortelzone, KG22 en ATP

In figuur 9 staan de resultaten weergegeven van de bemonstering van de wortelzones van de verschillende systemen op verschillende momenten in het jaar. Hoewel getracht is om hierbij steeds eenzelfde volume bodem (substraat) te bemonsteren, is dit mede door grote verschillen tussen de teeltsystemen lastig vergelijkbaar. De resultaten zijn derhalve zeer indicatief. Desondanks zijn patronen voor KG22 en ATP redelijk vergelijkbaar bij vergelijking van verschillende afdelingen in de tomatenopkweek, en bij vergelijking binnen teeltsystemen in de loop van de tijd. Tussen afdelingen in de tomatenopkweek is een toename van KG22 en ATP-gehalte te zien bij toenemende leeftijd van de tomatenplantjes. Mogelijk is dit het gevolg van een steeds betere doorworteling van het substraat, waardoor meer worteloppervlak (=meer microbiologische activiteit) per bemonsterd volume ontstaat. De patronen in de tijd binnen de verschillende teeltsystemen lijken redelijk vergelijkbaar voor KG22 en ATP.

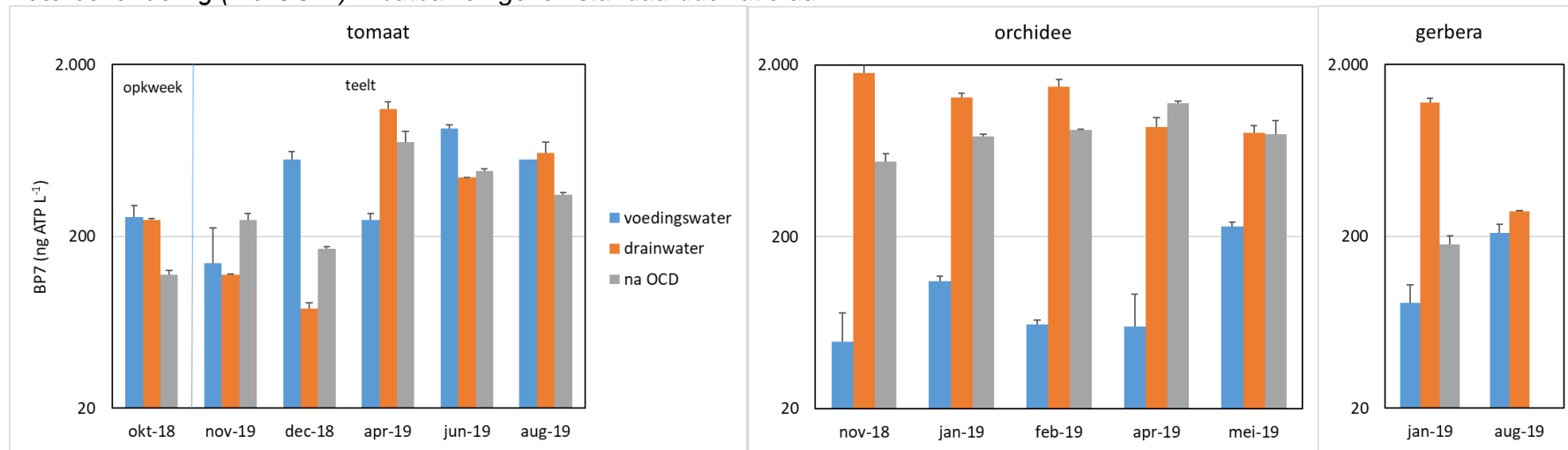
Figuur 9. Resultaten van de bemonstering van de wortelzones in de verschillende systemen: tomatenopkweek (van links naar rechts: zaailingen, oppotkweek, afkweek), tomatenteelt, potorchidee en gerbera. Links: KG22; rechts: ATP (foutbalken geven standaarddeviatie aan).



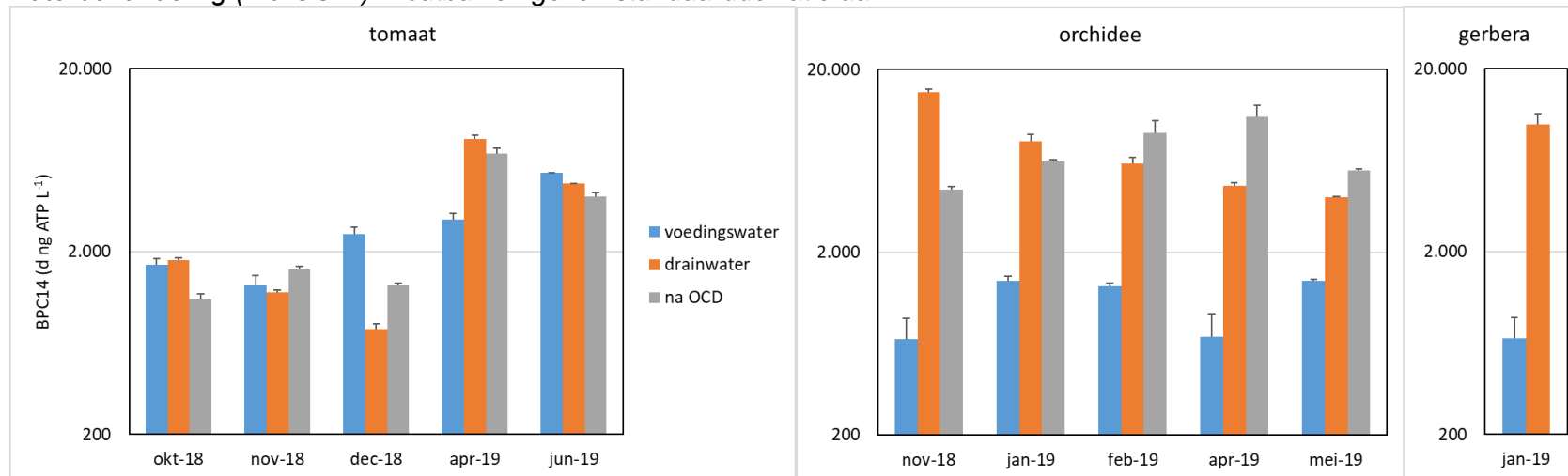
3.2.4 Biomassaproductiepotentie (BPP)

In figuur 10 staan de resultaten weergegeven voor de maximale ATP-concentratie gedurende de eerste zeven dagen van de incubatieperiode (BP7) en in figuur 11 de resultaten voor de cumulatieve ATP-opbrengst in 14 dagen (BPC14). De patronen van BP7 en BPC14 zijn per gewas/teeltsysteem en in de tijd zeer vergelijkbaar, wat aangeeft dat er weinig verschil zit tussen de resultaten voor de makkelijk afbreekbare organische stoffen (BP7) en de totale hoeveelheid afbreekbare stoffen. Bij potorchidee en gerbera is – zoals verwacht – een toename te zien in zowel BP7 als BP14 van voedingswater naar drainwater en/of behandeld water, wat laat zien dat de hoeveelheid organische stoffen toeneemt wanneer deze door het plant/bodemsysteem zijn gegaan. Bij tomaten is dit echter minder duidelijk: hier is het gehalte organische stoffen in het voedingswater al vrij hoog, en passage door plant/bodem lijkt net als de OCD weinig effect te hebben op hierop. Hierbij dient bedacht te worden dat de OCD -afhankelijk van de configuratie en instellingen – met opzet bepaalde organische stoffen doorlaat of zelfs toevoegt in het water dat wordt hergebruikt. Dit lijkt het geval te zijn bij potorchidee later in het seizoen: hier worden hogere BPC14-waarden gevonden na OCD, vergeleken met het oorspronkelijke drainwater.

Figuur 10. BP7 van watermonsters uit de verschillende systemen. Links: tomaat (opkweek en teelt); midden: phalaenopsis; rechts: snij-gerbera. Watermonsters zijn genomen in het voedingswater, drainwater en na waterbehandeling ("na OCD"). Foutbalken geven standaarddeviatie aan.



Figuur 11. BPC14 van watermonsters uit de verschillende systemen. Links: tomaat (opkweek en teelt); midden: phalaenopsis; rechts: snij-gerbera. Watermonsters zijn genomen in het voedingswater, drainwater en na waterbehandeling ("na OCD"). Foutbalken geven standaarddeviatie aan.



3.3 Discussie/conclusie

Dit betreft een eerste verkennend onderzoek naar de samenhang tussen microbiologische activiteit en organische stof in verschillende gewasteeltsystemen. Het laat zien dat het voedingswater in gewasteelt meestal relatief arm is in micro-organismen/microbiologische activiteit, dat deze toeneemt na passage door het plant/substraatsysteem en weer afneemt na waterbehandeling. Het effect van de gebruikte technologie (Opticlear Diamond) op het gehalte aan afbreekbare organische stof (BP7/BPC14) is complexer: door de desinfectiestap (waterstofperoxide) kan dit afnemen, maar omdat ook bepaalde organische stoffen doorgelaten worden, kan het organische-stofgehalte ook gelijkblijven. Bovendien kunnen ook nog extra organische stoffen gedoseerd worden in/na dit systeem. In dit onderzoek is een eerste verkenning gedaan van de mogelijke samenhang tussen organische stof, microbiologische activiteit en samenstelling van de microbiologische gemeenschap. Bijzonder hierbij is dat er metingen zijn gedaan op praktijkbedrijven. Dit maakt het aan de andere kant echter ook weer lastiger om de resultaten te duiden: voor dergelijke systemen is vaak een stuk minder goed aan te geven wat de exacte omstandigheden op het moment van monsternamen dan bij experimenten onder gecontroleerde (laboratorium)omstandigheden. Hier is getracht om het beste van beide werelden te verenigen: starten met het zoeken naar patronen van niet eerder onderzochte parameters in praktijksystemen, en deze vervolgens verder onderzoeken onder meer gecontroleerde laboratoriumomstandigheden. Uiteindelijk moet dit leiden tot meer inzicht in de complexe wisselwerking tussen organische stof en microbiologie, waarmee de tuinbouwsector beter kan sturen op een gezond en weerbaar teeltsysteem, zonder (teveel) gebruik te hoeven maken van ongewenste chemische stoffen.

4 Resultaten praktijkonderzoek (SCFF/GAC)

In dit onderzoek is gekeken naar de organische stoffen in waterstromen in de praktijk gelijktijdig aan het onderzoek zoals omschreven in H3. Hiervoor is op diverse praktijk bedrijven, namelijk opweek en teelt tomaat, snij-gerbera en phalaenopsis, water verzameld en geanalyseerd.

Omdat er weinig bekend is van de samenstelling van het organische stof is ervoor gekozen om de organische stof in de waterstromen te fractioneren op identiteit. Vervolgens zijn deze fracties toegevoegd aan de opkweek om eventuele effecten op de plant te bestuderen. Binnen het onderzoek is gekozen voor tomaat als modelplant vanwege de snelle groei.

4.1 Praktijk analyse

4.1.1 Inleiding

Op verschillende teeltbedrijven is gekeken naar de samenstelling van het organische materiaal in de waterstromen, d.i. drain, water na waterzuivering en rondom de wortels.

4.1.2 Materiaal & Methode

In totaal zijn er 17 bemonsteringen uitgevoerd: 2 keer bij snij-gerbera, 5 keer tomaat in de teeltfase, 5 keer tomaat in opkweekfase en 5 keer in de teelt van phalaenopsis. De bemonsteringen werden uitgevoerd op hetzelfde bedrijf (zie tabel 2).

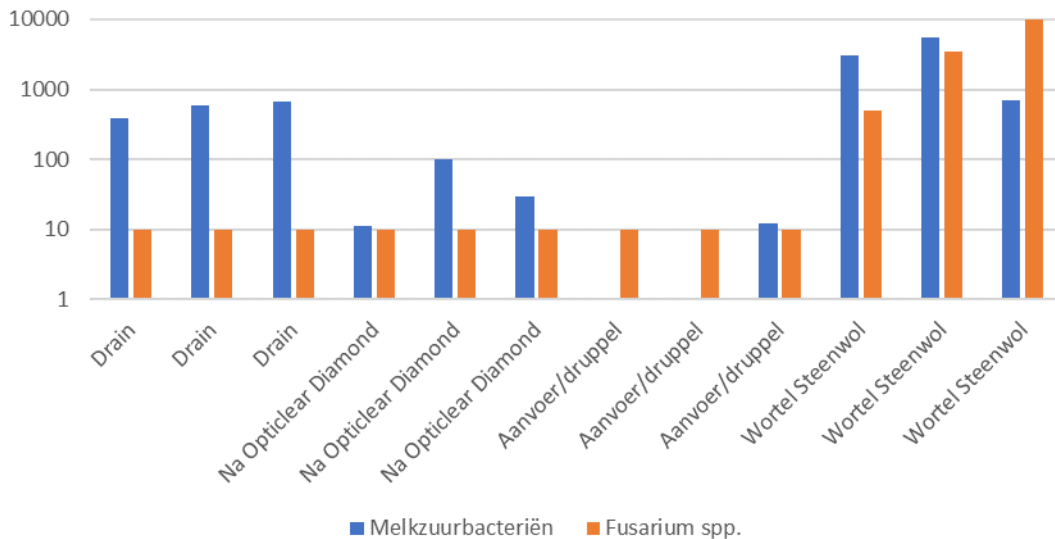
Tabel 2. Bemonsteringsschema van waterstromen op de diverse bedrijven (zie ook H3.1.1).

Gewas	Analyse	Bemonsteringsmomenten				
		Drainwater en water na Opticlear Diamond				
		1	2	3	4	5
<i>Gerbera</i>	Total organic carbon	X				X
<i>Tomaat teelt</i>	Total organic carbon	X	X	X	X	X
	Fractionering Organische stoffen*	X				X
	Screen GBM	X				X
<i>Tomaat opkweek</i>	Total organic carbon	X	X	X	X	X
<i>Potorchidee</i>	Total organic carbon	X	X	X	X	X

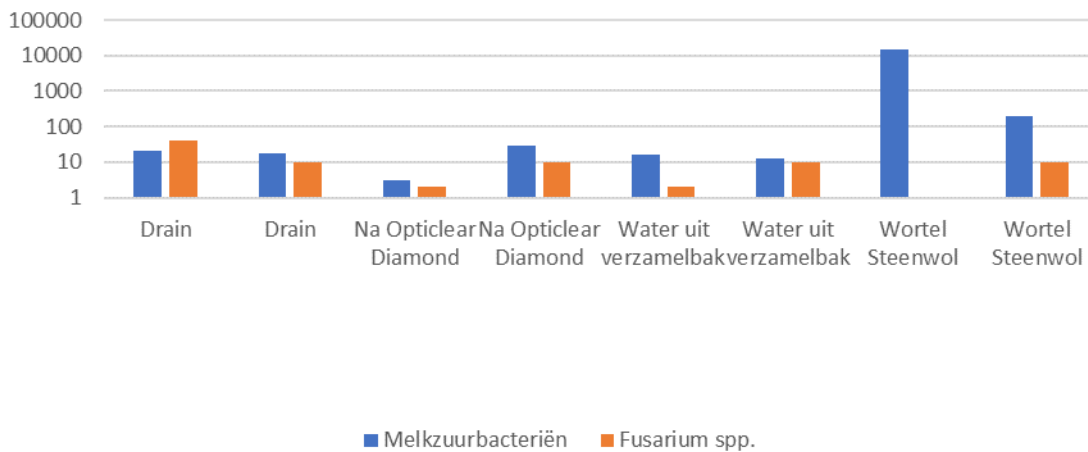
De fractionering van organische stof werd alleen uitgevoerd op monsters van de eerste en vijfde bemonstering van tomaat in de teeltfase. De fracties werden op een later moment gebruikt in een biotoets (zie H4.5). Organische stof wordt gefractioneerd in vijf fracties: Low Molecular Weight (LMW) zure fractie, LMW neutrale fractie, LMW basische fractie, High Molecular Weight (HMW) organische stoffractie >2 kDa, HMW organische stoffractie >20 kDa (Dalton is een maat voor het molecuulgewicht).

4.1.3 Resultaten

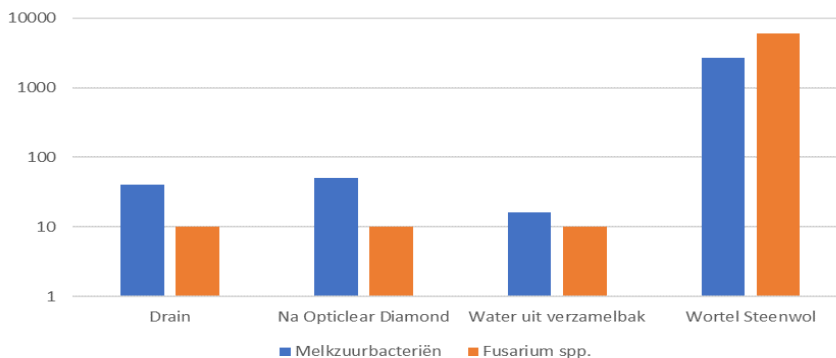
Vanuit de mouterij is er een oplossing gezocht naar het tegengaan van *Fusarium* door toevoeging van melkzuurbacteriën. In deze studie wordt er geen verband gevonden tussen melkzuurbacteriën en *Fusarium*, mede omdat er vaak geen *Fusarium* aanwezig is of in zeer lage aantallen. Figuur 12-14 laten zien dat *Fusarium* vooral wordt aangetroffen in de steenwol, ongeacht het type teelt, tomaat, snij-gerbera en phalaenopsis. Melkzuurbacteriën zijn vooral aanwezig in de steenwol en bij de teelt van tomaat in de drain. In de aanvoer (drip irrigatie) bij de teelt van tomaat zijn er weinig tot geen melkzuurbacteriën aangetroffen.



Figuur 12. Overzicht van melkzuurbacteriën en *Fusarium spp.* in de teelt van tomaat op verschillende locaties van het praktijkbedrijf (drain, na Opticlear Diamond, aanvoer/druppel, wortel steenwol). Monster locaties werden drie keer bemonsterd gedurende het jaar (08/4, 24/6, 12/8 2019). Dit wordt respectievelijk weergegeven in de grafiek. Aantallen in log kve/ml of log kve/g wortel.

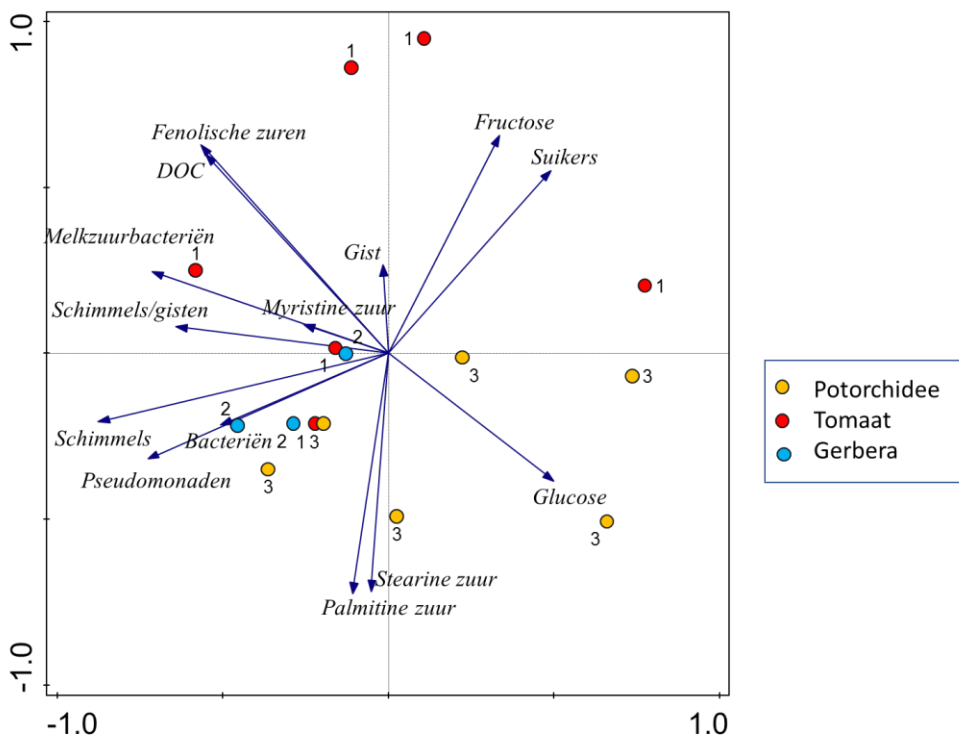


Figuur 13. Overzicht van melkzuurbacteriën en *Fusarium spp.* in de teelt van snij-gerbera op vier verschillende locaties van het praktijkbedrijf (12/8 2019). Aantallen in log kve/ml of log kve/g wortel.



Figuur 14. Overzicht van Melkzuurbacteriën en *Fusarium spp.* in de teelt van phalaenopsis op vier verschillende locaties (drain, water verzamelbak, na Opticlear Diamond, steenwol) van het praktijkbedrijf op twee momenten in het jaar (8/4, 13/5 2019). Aantallen in log kve/ml of log kve/g wortel.

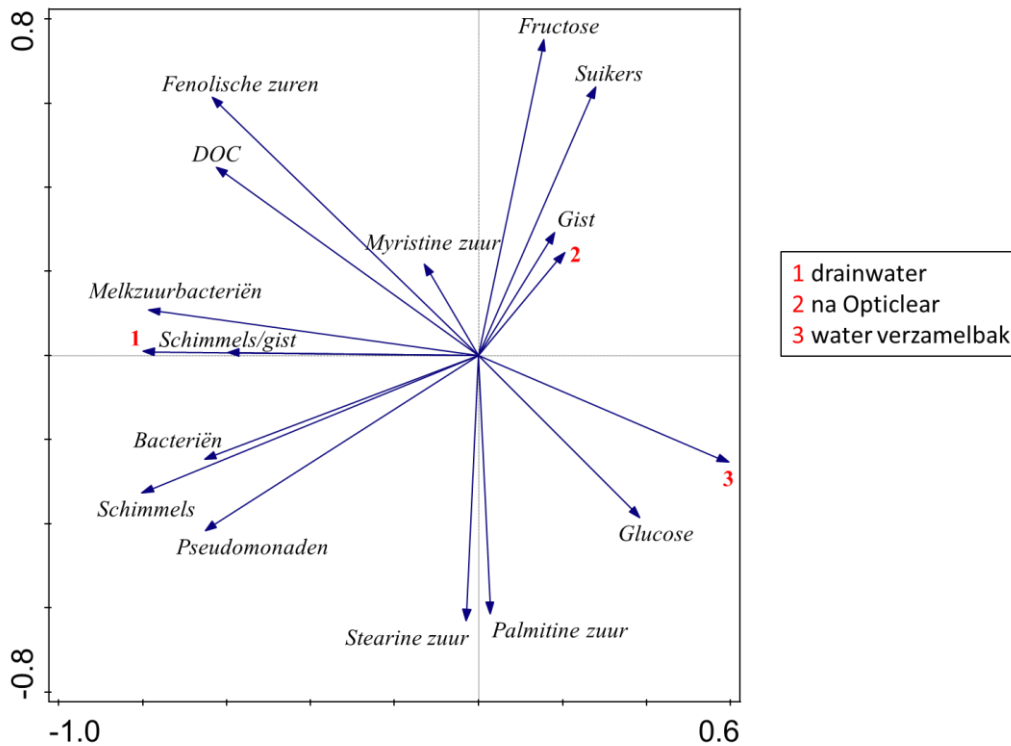
In een analyse waarin alle data is meegenomen (multivariate analyse) worden met behulp van een principale componenten analyse (PCA) de onderlinge relaties getoond. Een PCA zoekt naar de onderlinge correlaties tussen parameters en plaats de sterkste relaties op de x-as in een grafiek. Deze as verklaart in een PCA per definitie de meeste variatie in de dataset. De y-as verklaart de volgende belangrijkste relaties. De pijlen geven relaties aan tussen parameters. De langste pijlen hebben in de data de meeste invloed en pijlen in dezelfde richting hangen nauw samen. Figuur 15 laat een PCA zien waarin de monsters met alle data samengevat zijn in de tweedimensionale ruimte waarin de meeste variatie wordt verklaard door relaties tussen de parameters. Op de x-as is er een sterke samenhang in de data tussen aantallen schimmels, bacteriën en Pseudomonaden en de verhouding schimmels/gisten en melkzuurbacteriën. Op de y-as is er een belangrijke samenhang tussen palmatine-, en stearinezuur. Tussen beide assen in, is er een duidelijke samenhang tussen DOC en fenolische zuren en een negatieve relatie met glucose. De zes gele stippen representeren een samenvatting van de genomen monsters op het praktijkbedrijf phalaenopsis. In deze analyse is geen rekening gehouden met monsterdatum, specifieke locatie op het bedrijf. De gele stippen zijn voornamelijk te vinden in het IV kwadrant (rechts onderin). Het water op het praktijkbedrijf phalaenopsis wordt gedomineerd door de aanwezigheid van glucose en weinig melkzuurbacteriën, DOC en fenolische zuren. De rode stippen vertegenwoordigen de monsters die genomen zijn op het praktijkbedrijf tomaat. Dit ook weer zonder rekening te houden met monsterdatum en specifieke locatie op het bedrijf. Deze stippen bevinden zich voornamelijk in kwadranten I en II (bovenin de grafiek). Hieruit kunnen we afleiden dat er in het water weinig tot geen stearine- en palmitinezuur aanwezig is en gekarakteriseerd wordt door fenolische zuren, DOC, melkzuurbacteriën en fructose en suikers. Ten slotte bevinden de drie blauwe stippen (snij-gerbera) zich rondom de kruising van de assen. Dit wil zeggen dat er weinig effect is op de relaties die gevonden zijn in de PCA.



Figuur 15. PCA op basis van 15 monsters en 14 metingen waarbij de X-as 27% van de variatie en de Y-as 48% van de variatie verklaard zonder rekening te houden met

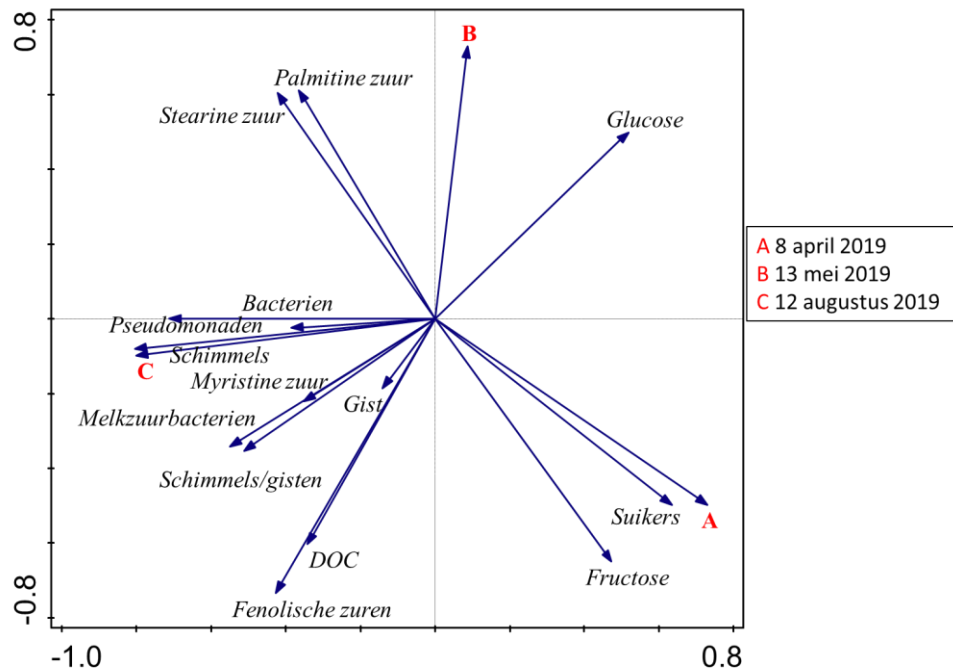
bemonsteringsdatum (dec 2018, jan, april, mei, juni, aug 2019) of locatie op het bedrijf (verzamelbak, drain of na de geavanceerde oxidatie door Opticlear Diamond). Alle data zijn $\log(2X+1)$ getransformeerd.

IN een PCA analyse met de focus op de locaties op het bedrijf, ongeacht type teelt, en bemonstering data, is de invloed van drainwater (1) het grootst op de data. In de drain bevinden zich in het algemeen de hoogste aantallen melkzuurbacteriën, bacetriën, schimmels, en in mindere mate Pseudomonaden, DOC en fenolzuren. Dit in tegenstelling tot het water na Opticlear Diamond (2) en in de water verzamelbak (3).



Figuur 16. PCA op basis van 15 monsters en 14 metingen waarbij de X-as 27% van de variatie en de Y-as 45% van de variatie verklaard zonder rekening te houden met bemonsteringsdatum (dec 2018, jan, april, mei, juni, aug 2019). De samenhang met de bemonsteringslocatie op het bedrijf (1 drain of 2 na Opticlear Diamond, 3 verzamelbak) is weergegeven. Alle data zijn $\log(2X+1)$ getransformeerd.

Ten slotte is er met behulp van een PCA weer gegeven dat als er alleen gekeken wordt naar de datum van bemonstering en niet naar het type teeltbedrijf of de specifieke locatie op het teeltbedrijf, dat er de grootste invloed is in augustus. Namelijk, er is duidelijk meer melkzuurbacteriën, myristinezuur, schimmels, pseudomonaden en bacteriën aanwezig dan in april en mei van dat jaar. In april is er meer suikers en fructose in het water en in mei in mindere mate glucose, palmatine-, en stearinezuur.



Figuur 17. PCA op basis van 15 monsters en 14 metingen waarbij de X-as 27% van de variatie en de Y-as 45% van de variatie verklaard met bemonsteringsdatum (dec 2018, jan, april, mei, juni, aug 2019) zonder rekening te houden met de bemonsteringslocatie op het bedrijf (1 drain of 2 na Opticlear Diamond, 3 verzamelbak). Alle data zijn $\log(2x+1)$ getransformeerd.

In een MANOVA analyse is ten slotte alle data geanalyseerd op verschillen tussen locaties 1, 2, 3, de teeltbedrijven en de tijdstippen. In de eerste kolom is aangegeven of er een significant effect te vinden is in een specifieke dataset, respectievelijk L (locatie), B (bedrijfstype), D (datum). Indien er een significant effect te vinden is in L, B of D, mag er vervolgens gekeken worden naar significante verschillen tussen de waarden in de betreffende kolom (*post-hoc* analyses). Hieruit blijkt dat er vooral verschillen te vinden zijn bij fenolische zuren, en de enkelvoudige suikers glucose en fructose in de waterstromen (in rood aangegeven). Fenolische zuren zijn in relatief hoge concentraties aanwezig in de drain (locatie 1) in phalaenopsis (bedrijf 1) en tomaat (2). Glucose wordt gevonden in met name snij-gerbera (3) en fructose vooral op het bedrijf met phalaenopsis en tomaat op de eerste monsterdatum in april 2019 (ten opzichte van mei en augustus).

Tabel 3. Manova analyse op gecorrigeerde verschillen tussen locaties, bedrijfstype en tijdstippen. Gemiddelden zijn gecorrigeerd co-variabelen. Bedrijfstype phalaenopsis (1) en tomaat (2) en snij-gerbera (3). 1=drain, 2=na Opticlear Diamond, 3=verzamelbak.

		Locatie			F.pr <0.05	Bedrijfstype			F.pr <0.05	Tijdstip		
		1	2	3		1	2	3		1	2	3
		n=3	n=6	n=6		6	3	6		7	2	6
	F.pr <0.05											
DOC	B	51,0	31,3	31,9	L	42,5	36,1	31,4	L	37,4	24,1	37,0
Fenolische zuren	L, B, D	133^a	57^b	28^b	B, L	111^a	86^{ab}	15^b	B, L	73	82	56
Glucose	B	0,04	0,03	0,07	B	0,001^b	0,007^b	0,103^a	B	0,06	0,04	0,03
Fructose	B, D	0,28	0,38	0,29	B, D	0,49^a	0,35^a	0,14^b	D, B	0,48^a	0,19^b	0,18^b
Suikers	D	0,32	0,40	0,36	D	0,49	0,36	0,24	D	0,54	0,23	0,20
Cysteinezuur		3,9	29,6	10,5		28,5	22,3	1,2		22,9	18,5	8,0
Palmatinezuur		32	38,3	36,3		29,3	24,4	48,5		27,6	37,3	45,3
Stearinezuur	D	38,7	29,8	29,2		23,3	33,4	39,9		20,4	32	45,5
Bacteriën (kve)		36593	24878	8992		18479	7252	34662		25563	832	26666
Pseudomonaden		1051	395	244		335	776	576		250	-16	1012
Melkzuur bacteriën		226	36	11	L	175	-33	63	L	70	162	87
Schimmels/gisten		227	469	218		323	270	377		393	-26	385
Gisten		-10	89	72		132	54	-16		85	72	20
Schimmels		249	362	91		154	185	357		262	-123	339

B=bedrijfstype, D=datum, L=Locatie ; s.e. gecorr. Met covar Bedrijfstype Fen zuren = 47,5; s.e. gecorr. Met covar Bedrijfstype glucose = 0,0432; s.e. gecorr. Met covar Bedrijfstype fructose = 0,1820; s.e. gecorr. Met covar Tijdstippen (datum) fructose=0,1760.

4.1.4 *Discussie en conclusie*

Bij de analyse van de fenolische zuren zijn er significante verschillen gevonden voor zowel locatie als bedrijfstype: De fenolische zuren worden vooral aangetroffen op het bedrijf met phalaenopsis (1) in de drain en na de Opticlear diamond (WaterIQ) waterbehandeling (1, 2). Glucose wordt vooral aangetroffen in de teelt van gerbera. Fructose wordt vooral aangetroffen op het bedrijf met phalaenopsis (1) en tomaat (2) in april 2019 (1). Alleen fenolische zuren zijn significant verschillend tussen locaties (1 drain of 2 na Opticlear Diamond, 3 verzamelbak) als gecorrigeerd wordt met bedrijfstype (phalaenopsis, snijgerbera en tomaat) en tijdstippen (april, mei, augustus). Dit betekent dat er een significante hoeveelheid uit de drain komt. Dit wordt overigens maar gedeeltelijk gerecirculeerd (zie tabel 3).

4.2 Analyse organisch materiaal

4.2.1 Inleiding

Om een idee te krijgen wat voor type stoffen mogelijk betrokken zijn bij een effect op de rhizosfeer gemeenschap van planten (het wortelmilieu), is een methode opgezet om porties kweekwater op te delen in fracties met verschillende types inhoudsstoffen. Gekozen is voor een schema waarin de laag-moleculaire-(LMW), organische verbindingen eerst werden geconcentreerd (met een daaropvolgende fractionering op basis van de zuurgraad van de aldus verkregen componenten), waarna de hoogmoleculaire verbindingen werden gefractioneerd. Een hindernis bij dit soort fractionering wordt gevormd door de grote volumina aan kweekwater, met lage concentraties van de stoffen waar de aandacht naar uitgaat als gevolg. De verzamelde fracties kunnen worden gebruikt voor teeltproeven om de invloed van de verschillende stofgroepen op de groei van planten te bepalen. Ook kan een indruk worden verkregen van de chemische samenstelling van de fracties.

4.2.2 Materiaal & Methode

Van alle ontvangen monsters kweekwater is het gehalte organische stof (o.s.) bepaald. Voor enkele monsterpunten in de tijd is tevens een fractionering uitgevoerd, om te zien hoe de o.s. verdeeld was over de verschillende typen opgeloste organische stoffen.

Om de in de rhizosfeer uitgescheiden componenten te groeperen is gekozen voor de volgende fractionering:

1. laag-moleculaire (LMW) zure niet-polaire verbindingen (fractie AF)
2. laag-moleculaire (LMW) neutrale niet-polaire verbindingen (fractie NF)
3. hoog-moleculaire (HMW) verbindingen met MW > 2 kDa
4. hoog-moleculaire (HMW) verbindingen met MW > 20 kDa
5. overige hydrofiele verbindingen

De verdeling van de fracties werd opgesteld en vergeleken voor aanvoerwater, drainwater en eventueel opgeschoond afvoerwater (Water IQ).

4.2.2.1 Fractie AG

Hiertoe werd de methode gebruikt beschreven in Lee et al. (2006) en Van Bost (2015): een portie van 8 L kweekwater werd geleid over een kolom van ca. 50 mL XAD-4 hars (max. snelheid 30 mL/min). Na afloop werd de XAD-4 hars behandeld met 5x 90 ml methanol. Deze werden gepoold waarna de methanol werd afgedampt. Deze fractie werd vervolgens aangevuld tot 20 mL met water en op pH=2.0 gebracht met zoutzuur, waarna in een scheitrechter werd uitgeschud met 3x 20 mL diethylether. De etherlagen werden gepoold, gedroogd over watervrij natriumsulfaat, en ingedampt. De droogrest werd opgenomen in enkele mL methanol en bewaard bij -20°C.

4.2.2.2 Fractie NF

De onder 1) verkregen waterlaag na ether-extractie werd gedroogd d.m.v. vriesdrogen.

4.2.2.3 MW verbindingen

Met behulp van Slide-A-Lyzer Dialyseflessen (Thermo Scientific) werd een volume kweekwater (standaard 1 fles = 250 mL) gedurende 2 dagen gedialyseerd tegen 5 L demiwater. Hierdoor werd een verrijking verkregen van de opgeloste stoffen met een molecuulmassa hoger dan de *cut-off* rangen van de flessen. Twee typen werden gebruikt, 1 met *cut-off* van 2 kDa, 1 met een *cut-off* van 20 kDa. Verversing van het demiwater geschiedde volgens het bijgeleverde protocol, ten minste 2 maal per dag. Na afloop werd de inhoud van de fles(sen) overgebracht in afsluitbare buizen en ingevroren bij -20°C.

overige hydrofiele verbindingen

Het kweekwater na doorloop door de onder 1) genoemde XAD-kolom werd bewaard. Dit bevat de polaire verbindingen (die niet binden aan de XAD-4 hars), zowel laag- als hoog-moleculair. Er is niet voor gekozen om eerst fractionering op molecuulmassa te doen en

vervolgens de fractionering m.b.v. binding aan XAD-4, omdat dan een volume van 8 L kweekwater gedialyseerd zou moeten worden, hetgeen een erg langdurige geschiedenis zou gaan worden.

4.2.2.4 OS, organische zuren, vetzuursamenstelling en fenolische zuren

Van alle verkregen fracties werd het gehalte organische stof (o.s.) bepaald. Hiertoe werd 8 mL van het kweekwater (van fracties AF en NF een verdunning) gevriesdroogd in een Pyrexbuis met schroef dop. De droogrest werd behandeld volgens ISO-14235, maar op een kleinere schaal: 1.0 mL kaliumdichromaatoplossing (0.333 M) werd toegevoegd, alsmede 1.6 mL geconcentreerd zwavelzuur, waarna verwarmd werd bij 130°C gedurende 30 min. Na afkoelen werd aangevuld tot 10.0 mL, waarna de absorptie werd bepaald bij 590 nm.

Het gehalte o.s. werd bepaald aan de hand van een kalibratie curve gemaakt met verschillende concentraties glucose, op gelijke wijze behandeld als de monsters.

Tevens werd het gehalte aan organische (oxaal-, mieren-, azijn-, propion-, melk-, appel-, citroen-, barnsteen- & boter-)zuur bepaald, eveneens volgens een routinematig uitgevoerd protocol. Omdat de concentraties van deze zuren erg laag bleken, was het noodzakelijk vooraf een concentratie van het kweekwater uit te voeren door vriesdrogen en het opnieuw oplossen in een kleiner volume. Dit kon echter niet te ver doorgevoerd worden omdat dan de monsters te stroperig werden: een concentratie van 20x was veelal het maximum. Ook werd de vetzuursamenstelling van de monsters bepaald; hiervoor werd een GC-methode met FID-detectie gebruikt.

Het suikergehalte van de monsters werd bepaald met ion chromatografie. Hiertoe bleek het ook noodzakelijk de monsters te concentreren omdat veelal de concentraties te laag ten opzichte van de detectielimiet.

Fenolische verbindingen werden bepaald door reactie met *Folin-Ciocalteu* reagens, in vergelijking met een standaardcurve, opgesteld met chlorogeenzuur.

Een HPLC-assay op fenolische zuren is uitgevoerd op de AF-fracties van WE 4, 5, 27 en 28 (resp. drainwater tomaat 20181123, aanvoerwater tomaat 20181123, aanvoerwater tomaat 20190812, drain tomaat 20190812).

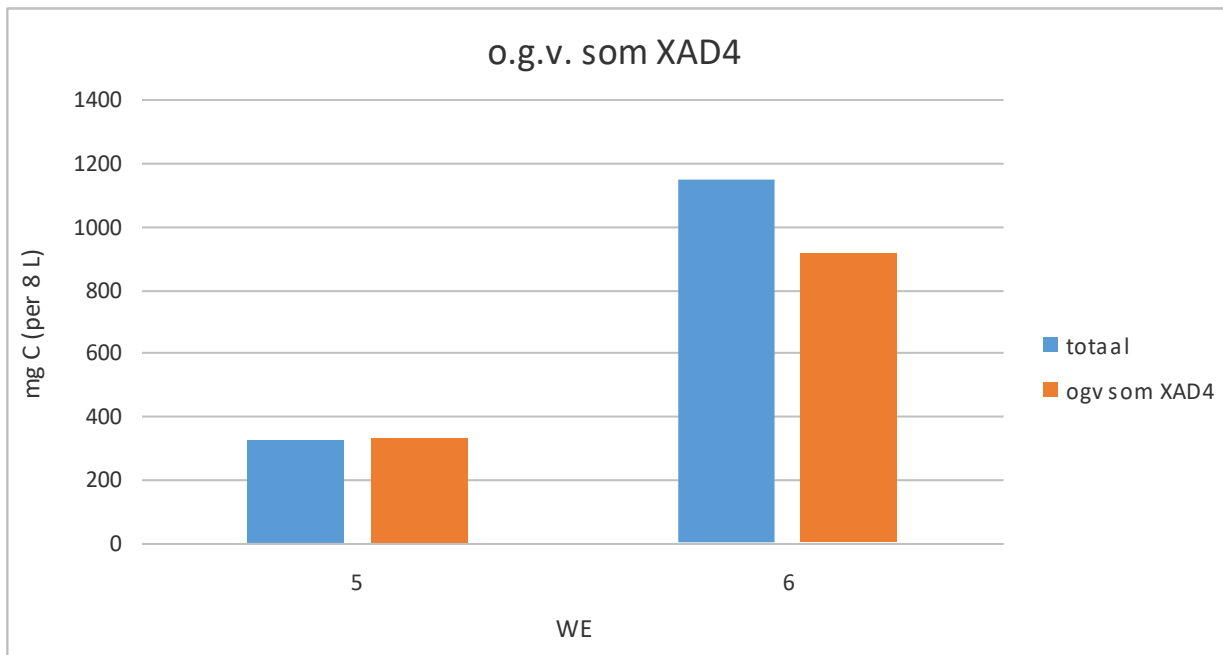
4.2.3 Resultaten

Uit de analyses op o.s. is gebleken dat dit altijd hoger is in drainwaters dan in het oorspronkelijke aanvoerwater. De hoeveelheden gemeten o.s. zijn gebruikt als graadmeter om na uitgevoerde fractionering te zien hoe deze zich verhouden. Met andere woorden hoe de verdeling van o.s. over de verschillende fracties was. Voor de gefractioneerde sets van kweekwater (telkens een aanvoerwater en een drainwater) zag dit beeld uit als weergegeven in figuren 1, 2 en 3.

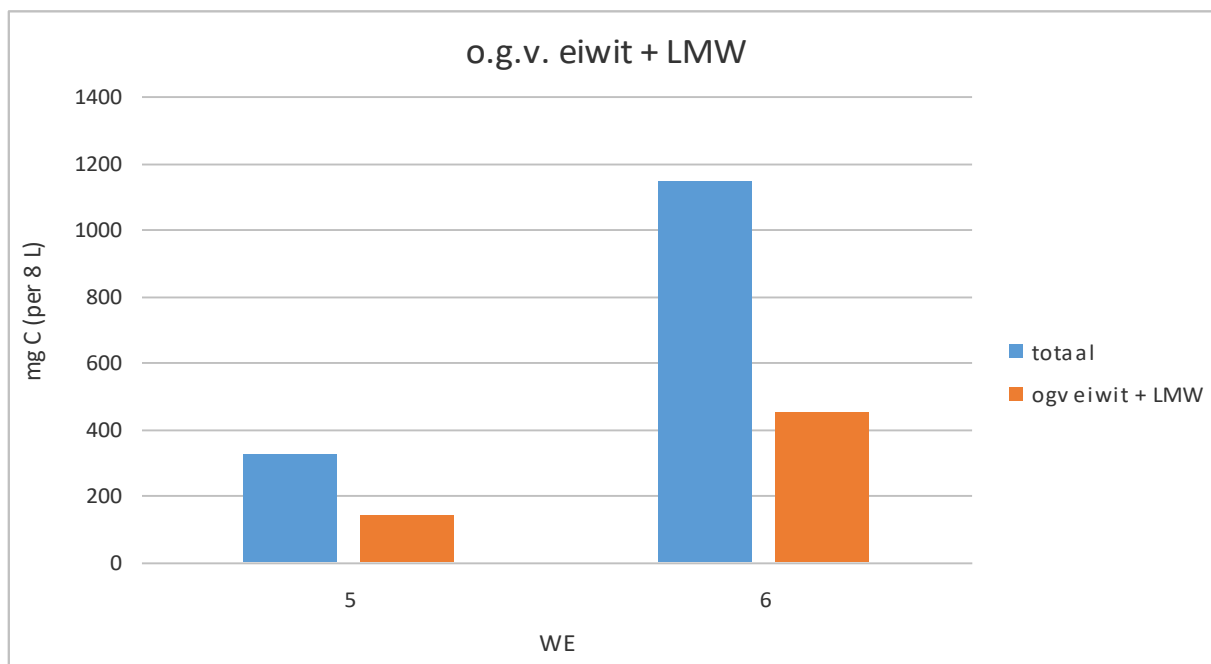
Te zien is dat de concentratie o.s. in drainwater fors hoger is dan in het aanvoerwater. Dat was volgens de verwachting, maar bevestigt dat er organische stoffen worden uitgescheiden in het kweekwater (fig. 1).

Na fractionering over XAD-4 is het organische stof (de som van de hoeveelheid o.s. in de LMW niet-polaire fractie) plus die in de doorloop min of meer gelijk aan het gehalte in de uitgangsooplossing (fig. 2). Dit kan als controle gezien worden dat er weinig tot geen o.s. verloren is gegaan tijdens deze fractionering.

Het gehalte o.s. in de XAD-4-fractie plus dat in de fractie met hoog MW is niet gelijk aan het totaal o.s.-gehalte van de uitgangsooplossing. Dit verschil is aanzienlijk groter in de drain t.o.v. dat in het aanvoerwater. Het geeft aan dat er waarschijnlijk organische stof aanwezig is die niet bindt aan de XAD-4 maar ook niet van voldoende hoog MW is om in de HMW-fractie terecht te komen. Te denken valt hierbij aan relatief kleine polaire verbindingen als (o.a.) suikers, oligosachariden en aminozuren.



Figuur 18. Gehalte organische stof in aanvoerwater (WE 5) en drain (WE 6). 'Totaal' = gemeten in oorspronkelijke monster; 'ogv som XAD4' = gehalte in XAD-4-fractie plus gehalte in het restwater (doorloop XAD-4).



Figuur 19. Gehalte organische stof in aanvoerwater (5) en drainwater (6). 'Ogv eiwit + LMW': de som van de gehalten o.s. in XAD-4-fractie (LMW, niet polair) en in HMW-fractie (eiwitten en bijv. polysuikers).

4.2.3.1 Organische (niet fenolische) zuren

De gevonden concentraties organisch (niet fenolisch) zuur waren erg laag, bijna altijd onder de detectielimiet. Hierdoor had deze assay weinig waarde in dit project.

4.2.3.2 Suikers

Ook bij de suikerbepaling was er vaak sprake van waarden onder de detectielimiet, ondanks een concentratie van de monsters door vriesdrogen en opnieuw oplossen in een kleiner volume. Van de 5 standaard geteste suikers werden alleen glucose en fructose teruggevonden.

4.2.3.3 Fingerprint vetzuren

Vetten zijn in het waterige milieu van kweekwater in zeer geringe hoeveelheden aanwezig. Door de gevoelige meetmethode kon wel een indruk verkregen worden van de samenstelling van de hierbij betrokken vetzuren. In bijna alle gevallen werd de hoofdmoot gevormd door palmitinezuur (C_{16:0}), veelal gevolgd door stearinezuur (C_{18:0}) en myristinezuur (C_{14:0}). Onverzadigde vetzuren waren in de minderheid, al werd één keer in drainwater uit tomatenkweek een hoog percentage hiervan gevonden (28% oliezuur, 25% linolzuur, 15% linoleenzuur). Ook in drainwater uit gerberakweek werden één keer onverzadigde vetzuren aangetroffen (14% oliezuur, 14% linoleenzuur). De betekenis van de verdeling verzadigde vs. onverzadigde vetzuren is vooralsnog onduidelijk.

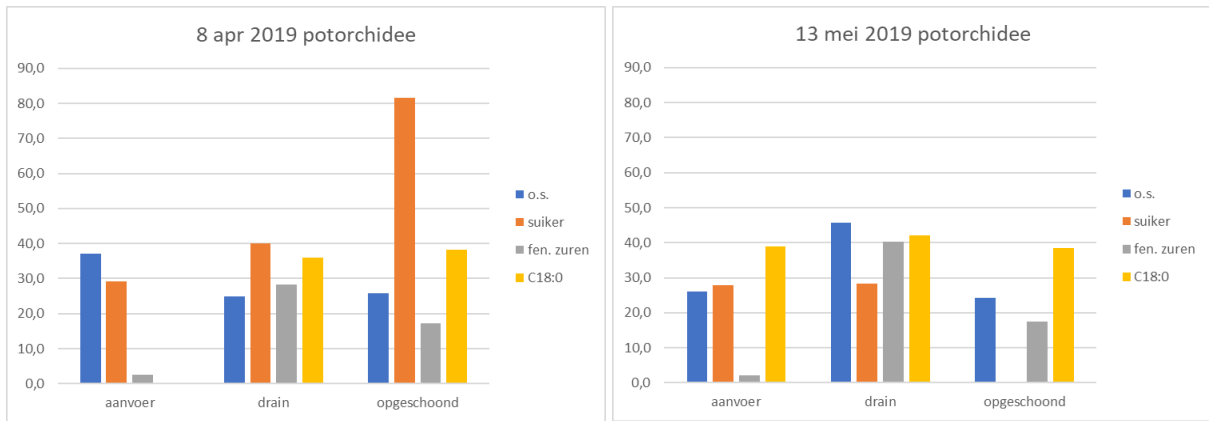
4.2.3.4 Fenolische verbindingen

Verbindingen met een fenolische groep werden in wisselende hoeveelheden in de kweekwaters aangetoond. Hierbij bleek een correlatie zichtbaar: de concentratie ervan was verhoogd in het drainwater, al was die niet altijd even duidelijk. Bij specifiek testen met HPLC-DAD van de hoge concentraties fenolische verbindingen op fenolische zuren kon alleen benzoëzuur worden aangetoond. De hoeveelheid hiervan alleen was echter ruim onvoldoende om de toename aan fenolische stoffen te verklaren. Ofwel worden er dus andere– niet zure– fenolische stoffen uitgescheiden in de drainfractie, ofwel zijn er zuren aanwezig waar niet in de assay op getest is: de set van referentiestoffen was met 12 verschillende zuren niet compleet te noemen.

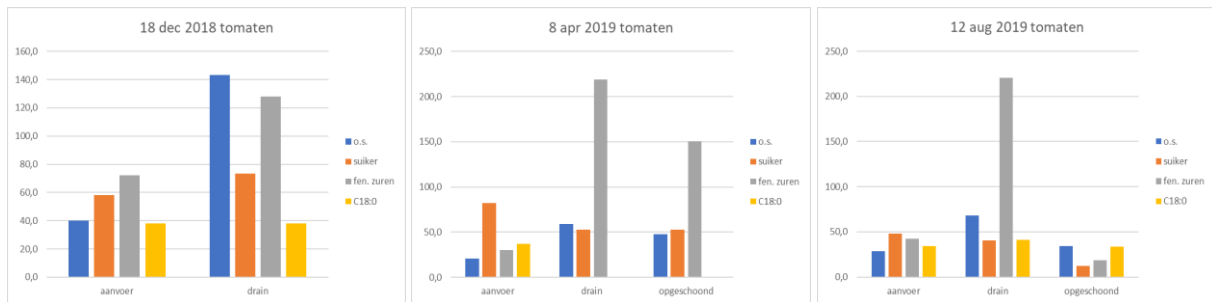
Het verdient aanbeveling deze fenolische fractie nader te onderzoeken: fenolen spelen een belangrijke rol in de geïnduceerde resistentie door *P. fluorescens* in o.a. komkommer en tomaat en zijn vaak fungitoxisch. In de studie van Steinkellner et al. (2005) werd aangetoond dat het wegvangen van fenolische verbindingen in tomaten wortellexudaten, de onderdrukking van *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) tegen ging.

Als er wordt gekeken naar de gehalten van o.s., suikers en fenolische verbindingen in aanvoer-, drain-, en opgeschoond water, alsmede het percentage stearinezuur van het totaal-vetzuurpatroon daarin dan is te zien dat dit niet altijd volgens een vast patroon verloopt (zie figuren 4, 5 & 6). Wel zijn de gehalten o.s. en fenolische verbindingen verhoogd in drainwater, terwijl het percentage stearinezuur tamelijk constant lijkt te zijn, evenals het suikergehalte (hoewel het beeld hiervan door de erg lage meetwaarden niet helemaal duidelijk is).

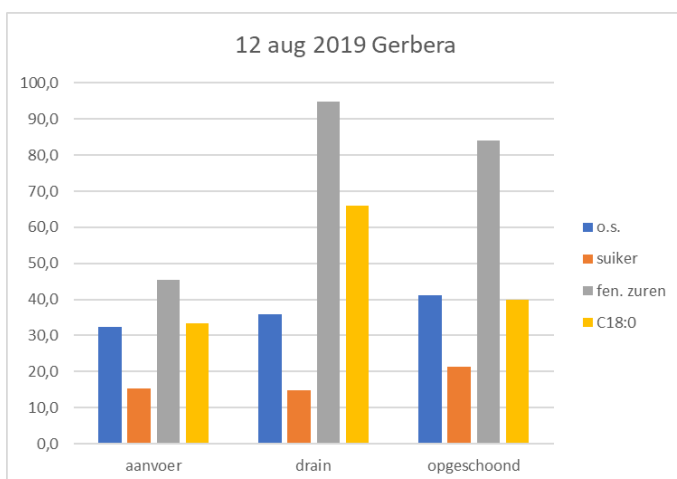
Er lijken dus, afgezien van o.s. en fenolische stoffen, vooralsnog geen duidelijke markers te zijn als het gaat om vergelijking van de samenstelling van aanvoerwater en gebruikt water in hydrocultuur.



Figuur 20. Organische stof, totaal suiker, fenolische verbindingen en percentage stearinezuur in aanvoer-, drain- en opgeschoond water bij 2 monstersets van één (orchidee)kweek. Schaal: o.s. in mg/L, suikers in mg/L *100, fenolische zuren in µM, C18:0 in % van totaal FA.



Figuur 21. Organische stof, totaal suiker, fenolische verbindingen en percentage stearinezuur in aanvoer-, drain- en opgeschoond water bij 3 monstersets van één (tomaten)kweek. Schaal: o.s. in mg/L, suikers in mg/L *100, fenolische zuren in µM, C18:0 in % van totaal FA.



Figuur 22. Org. stof, totaal suiker, fenolische verbindingen en percentage stearinezuur in aanvoer-, drain- en opgeschoond water bij 3 monstersets van één (Gerbera)kweek. Schaal: o.s. in mg/L, suikers in mg/L *100, fenolische zuren in µM, C18:0 in % van totaal FA.

4.2.4 Conclusie & discussie

Uit de analyses van de verschillende fracties, verkregen door fractionering van aanvoer- en drainwatermonsters, kan het volgende geconcludeerd worden:

De verschillen tussen aanvoer- en drainwater worden vooral bepaald door fenolische zuren en stoffen met een hogere moleculaire massa. Deze laatste zijn bepaald als de fractie met MW > 2 kDa (en 20 kDa). De vastgestelde toename hiervan in drainwater is onvoldoende om de toename hierin van de hoeveelheid organische stof te verklaren, zelfs als gecorrigeerd wordt voor de toename in verbindingen met een laag MW, zoals gevonden in de aan de XAD4-hars gebonden componenten.

Het gehalte organische stof (o.s.) is hoger in drainwater dan in aanvoerwater. Dit is volgens verwachting: drainwater bevat wortellexudaten en die zullen wezenlijk bijdragen aan het o.s.-gehalte van het water. Het suikergehalte van de waters is in het algemeen erg laag. Doordat dicht tegen de aantoonbaarheidsgrens wordt gemeten is het moeilijk een goed beeld te krijgen van de suikerconcentraties, zelfs na concentratie van de monsters door vriesdrogen en opnieuw op te lossen in een kleiner volume. Het probleem van aantoonbaarheid geldt ook voor de niet-fenolische organische zuren. Fenolische verbindingen zijn sterk verhoogd in de drainfracties. Identificatie ervan is echter moeilijk gebleken; alleen benzoëzuur kon worden aangetoond, maar slechts in hoeveelheden die niet de volledige toename van fenolische stof konden verklaren.

Het verdient aanbeveling deze fenolische fractie nader te onderzoeken: fenolen spelen een belangrijke rol in de geïnduceerde resistentie door *P. fluorescens* in o.a. komkommer en tomaat en zijn vaak fungitoxisch. In de studie van Steinkellner et al. (2005) werd aangetoond dat het wegvangen van fenolische verbindingen in tomaten wortellexudaten, de onderdrukking van *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) tegen ging.

De vetzuursamenstelling van de verschillende fracties heeft geen duidelijke correlaties aan het licht gebracht.

4.3 Proef opkweek en teelt tomaat

4.3.1 Inleiding

Naar aanleiding van de resultaten van de praktijkbemonstering is gekeken of stoffen een positieve of negatieve werking hebben op planten. Hiervoor zijn twee praktijkproeven uitgevoerd bij de opkweek van tomaat bij een opkweekbedrijf. Hierbij zijn bij elke watergift met tomatenvoeding aan de behandelingen bepaalde exudaten toegevoegd. Bij de eerste proef is ook gekeken naar de effecten die het opgroeien met toegevoegde exudaten in de opkweekperiode later in de teelt kunnen hebben. Het gewas ging na de opkweekfase naar teler Vereijken en is daar (zonder voortzetting van de wortellexudaten behandelingen) beoordeeld door de teler gedurende de rest van de teelt.

Doel van beide onderzoeken is om vast te stellen of de teelt positief beïnvloed kan worden door het toevoegen van wortellexudaten. Enerzijds wordt naar de groei gekeken onder invloed van de wortellexudaten, en anderzijds naar de samenstelling van micro-organismen. De gebruikte exudaten zijn gekozen op basis van de literatuur. Hierbij is enerzijds gekeken naar de meest bekende geïdentificeerde exudaten bij tomaat, en anderzijds welke exudaten bekend stonden om hun gunstige werking, bijv. de aantrekking van PGPR. In de eerste praktijkproef zijn 5 wortellexudaten behandelingen toegepast:

Tabel 4. Overzicht van behandeling van tomaat in opkweek met wortellexudaten s.l.

Behandeling	Verklaring
OSL	OSL is niet, zoals de overige exudaten, één molecuul, maar een mengsel ontwikkeld door Water IQ. De precieze samenstelling wordt niet vrijgegeven.
Vanillinezuur	Dit is een (fenolische) vetzuur en leidt in komkommer tot een verandering in wortel microbiële gemeenschappen (toename PGPR) (Zhou en Wu 2018).
Coumarinezuur	Dit zorgt bij Fe-tekort voor ijzermobilisatie. Is ook in verband gebracht met een toename van PGPR (o.a. gunstige pseudomonaden) (Lundberg en Teixeira, 2018). Afname <i>Fusarium oxysporum</i> / <i>Verticillium dahliae</i> in Arabidopsis (Stringlis et al., 2018).
Appelzuur	Dit is een organisch zuur en is betrokken bij mobilisatie PGPR (pseudomonaden, <i>Bacillus</i> spp.) (Oku et al. 2014; de Weert et al. 2002).
Cysteinezuur	Stimuleert <i>Pseudomonas fluorescens</i> , en is ook een molecuul in planten-metabolisme dat zorgt voor synthese van essentiële moleculen en verdedigingsverbindingen



Figuur 23. Proefveld bij opkweekbedrijf. Proefplanten zijn verhoogd met kratten, zodat ze buiten bereik staan van het eb- vloedstelsel en krijgen aparte watergift met toegevoegde exudaten.

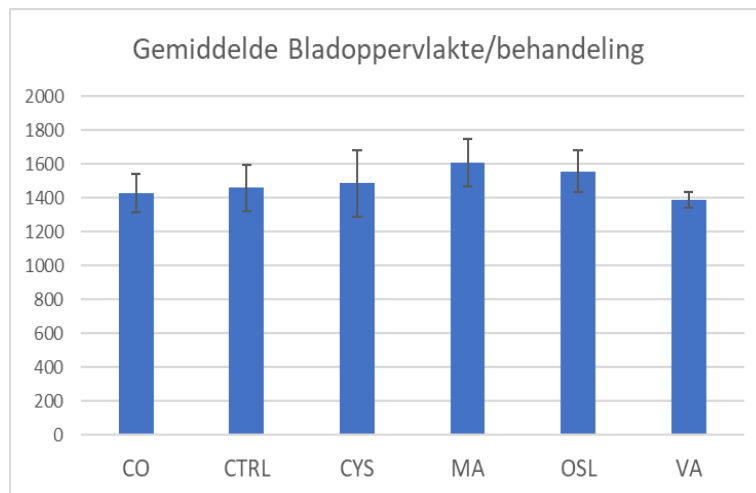
4.3.2 Materiaal & Methode

4.3.2.1 Proef 1

Bij de eerste opkweekproef zijn door de teler opkweekplanten in zes groepen ingedeeld, die vanaf de oppotfase één van de onderstaande behandelingen kregen, ingegoten met watergift. De behandelingen zijn OSL, vanillinezuur, appelzuur, coumarinezuur, cysteinezuur, en een onbehandelde controle. De proef duurde zes weken met cocktail tomaten ras – geënt op Maxifort. Aan het eind van de opkweek werden zes planten per behandeling destructief gesampled en geanalyseerd op: groei (chlorofylgehalte 3x per plant, stengelgewicht, vers gewicht blad, drooggewicht blad, SLA (*Specific Leaf Area*), bladoppervlak), hoofd- en sporenelementen, en algemene screening groepen micro-organismen door middel van uitplaattechnieken. Er werden geen significante verschillen gevonden. Appelzuur en OSL-behandelde planten leken net iets groter gem. bladoppervlak en stengelgewicht te hebben. Appelzuur lijkt hiernaast ook een hoger bladgewicht te hebben.

De SLA lijkt hoger in de planten behandeld met cysteinezuur en OSL dan controle en overige behandelingen. De tabel hieronder is een voorbeeld, overige metingen, zoals chlorofyl, stengel vers gewicht, SLA en bladgewicht, vertoonde geen significante resultaten.

Reden van trendobservatie in combinatie met laag aantal herhalingen per behandelingen (n=6) is de aanleiding geweest voor proef 2.



Figuur 24. Gemeten gemiddelde bladoppervlakte per behandeling. Coumarinezuur (CO), Controle (CTRL), cysteinezuur (CYS), appelzuur (MA), OSL, vanillinezuur (VA). $p=0.181$ (one-Way Anova).

De behandeling die appelzuur heeft gekregen, heeft significant minder Na in het blad dan de controle, coumarinezuur en OSL-behandelingen. De appelzuurbehandeling verschilt niet significant van de vanillinezuur- en cysteinezuur behandeling.

De cysteinezuur behandelde planten bevatten daarentegen minder Mg dan de controle en coumarinezuur behandeling, maar verschilt niet significant van de rest.

Voor de overige nutriënten is geen significant verschil gevonden tussen de behandelingen.

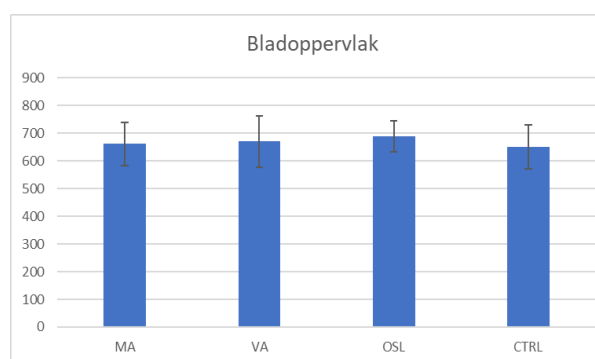
Tabel 5. Overzicht van micro-organismen na de behandelingen met wortellexudaten.

	OSL	CYS	CTRL	VA	CO	MA
Kiemgetal bacteriën (10^6)	48	110	40	64	30	58
<i>P. fluorescens</i>	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Melkzuur bacteriën (10^3)	20	>30	>30	8,1	>30	>30
Kiemgetal schimmels/gisten (10^3)	210	320	221	331	71	170
<i>Cladosporium</i> spp.	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>Penicillium</i> spp.	100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>Trichoderma</i> spp.	<100	<100	<100	<100	<100	<100
<i>Fusarium</i> spp. (10^3)	40	10	1	1	20	10
<i>Acremonium</i> spp. (10^3)	140	80	170	140	30	40
Gisten	<100	<100	<100	<100	1000	<100
Overige schimmels (10^3)	30	230	50	190	20	120
<i>Pythium</i> spp.	-	+	-	-	+	+
<i>Phytophthora</i> spp.	-	-	-	-	-	-

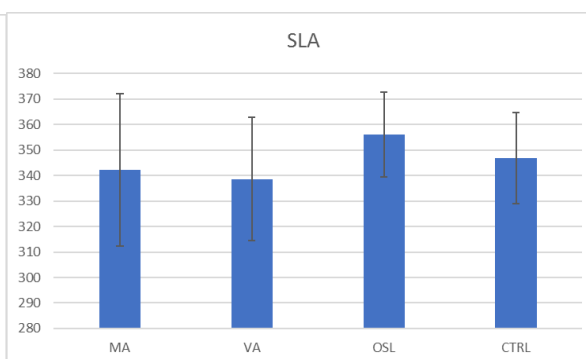
4.3.2.2 Proef 2

Omdat bij de eerste praktijkproef enige trends waarneembaar leken te zijn, maar niet statistisch significant aan te tonen waren, is praktijkproef 2 uitgevoerd. Bij deze proef werden 12 planten per behandeling gesampled in plaats van zes zoals bij proef 1, zodat eventuele trends duidelijker aantoonbaar zouden worden. De planten werden behandeld met vanillinezuur, appelzuur, OSL. De proef duurde zes weken en ras Cherry tros tomaat – geënt op Maxifort. Aan het eind van de opkweek werden 12 planten per behandeling destructief gesampled en geanalyseerd op dezelfde groeiparameters als proef 1.

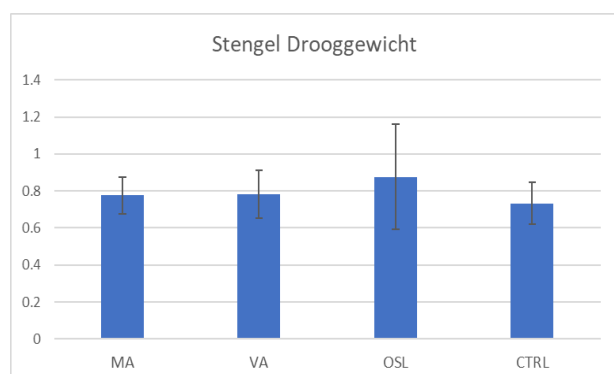
Ondanks het hogere aantal herhalingen per behandeling ($n=12$) zijn de groeiparameters van proef 2 ook niet statistisch significant. De tabellen hieronder zijn een voorbeeld, overige metingen, zoals chlorofyl, stengel vers gewicht, bladgewicht vers en droog, hadden ook geen significante resultaten. De spreiding tussen planten onderling was vrij hoog.



Figuur 25. Gemeten bladoppervlakte/behandeling. $p=0.717$ (Anova).



Figuur 26. Gemeten SLA/behandeling. $p=0.776$ (Anova).



Figuur 27. Gemeten stengel drooggewicht/behandeling) $p=0.277$ (Anova)

Geen enkele behandeling laat significante verschillen zien in de nutriënteninhoud van het blad. Ook appelzuur niet, dat in de vorige proef significant minder natrium in het gewas had dan de controle.

Tabel 6. Overzicht van micro-organismen na de behandelingen met wortellexudaten.

	VA	MA	OSL	CTRL
Kiemgetal bacteriën (10^6)	210	220	180	170
<i>P. fluorescens</i> (10^3)	<10	<10	<10	<10
Melkzuur bacteriën (10^3)	1,5	34	46	24
Kiemgetal schimmels/gisten (10^3)	142	210	45	148
<i>Cladosporium</i> spp.	<10	10.000	1000	<10
<i>Penicillium</i> spp.	<10	2000	3000	4000
<i>Trichoderma</i> spp.	<10	<10	<10	<10
<i>Fusarium</i> spp. (10^3)	90	110	21	140
<i>Acremonium</i> spp.	<10	<10	<10	<10
Gisten (10^3)	2	10	8	4
Overige schimmels	50.000	80.000	12.000	<10
<i>Pythium</i> spp.	-	-	-	+
<i>Phytophthora</i> spp.	-	-	-	-

Zoals in bovenstaande tabellen te zien is, variëren de kiemgetallen en aanwezige groepen micro-organismen naar aanleiding van een bepaalde behandeling. De variatie op een bepaalde behandeling, is niet altijd consistent tussen de twee proeven. Wel is zichtbaar dat beide keren vanillinezuur (VA) leidde tot een vrij kleine hoeveelheid melkzuurbacteriën, vergeleken bij de andere behandelingen. Ook is beide keren de aanwezigheid van *Fusarium* spp. tamelijk laag in de vanillinezuur behandelingen. Opvallend is dat OSL elke keer qua kiemgetal bacteriën iets hoger zit dan de controle, en appelzuur (MA) en vanillinezuur daar beide keren weer net iets bovengit steken. Het kiemgetal van schimmels en gisten is bij proef 2 een stuk lager dan de rest bij de OSL behandeling, hetgeen in proef 1 niet naar voren kwam.

4.4 Pilot Fusarium

4.4.1 Inleiding

Voor het testen van de nieuwe klimaatcellen is er een kleine tussentijdse extra proef ingezet. Deze proef diende om de juiste inoculatieconcentratie *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) te bepalen, en te meten hoeveel watergift er nodig was gedurende de opkweekperiode in de klimaatcellen. Dit laatste was belangrijk, zodat ingeschat kon worden

of de hoeveelheid gefractioneerde drain-, en druppelwater genoeg was (8 liter) om de gehele fractieproef (zie hoofdstuk H4.5) mee uit te voeren.

Voor de exudaten is gekozen, enerzijds omdat ze voorkomen in wortellexudaten van tomaat, en anderzijds omdat beide in de literatuur indirect een gunstige werking kunnen hebben op plantweerbaarheid. Fumaarzuur, omdat het een belangrijke rol speelt bij chemotaxis (opsporing door-, en aantrekking van) PGPR (Kamilova et al. 2006a) en citroenzuur, omdat onder invloed van *P. fluorescens*, een PGPR, citroenzuur in de wortels van tomaat verhoogd en barnsteenzuur verlaagd blijkt te worden, terwijl onder invloed van FORL het citroenzuur juist verlaagd wordt, en barnsteenzuur verhoogd. Naast dat *P. fluorescens* de aanwezigheid van citroenzuur in tomatenwortel zelf verhoogt, speelt citroenzuur ook een belangrijke rol bij de beweging van deze PGPR naar de plantenwortels toe (Kamilova et al. 2006b).

4.4.2 Materiaal & Methode

Bij de testproef zijn 30 planten per behandeling in de klimaatkamer neergezet. De planten zijn gedurende de gehele proef ingegoten met bassinwater met tomatenvoeding, en hieraan toegevoegd een exudaat. De ingietbehandelingen zijn tegelijkertijd met de transplantatie op steenwol begonnen. Een week na start van de ingietbehandelingen zijn de wortels beschadigd van alle planten, waarna bij 1/3 van de planten (dus 10 per behandeling) FORL sporensolutie (2×10^4) ingegoten werd, bij een derde FORL sporensolutie (8×10^5) en bij 1/3 eenzelfde hoeveelheid water.

De behandelingen waren OSL, Fumaarzuur, Citroenzuur in een proef met looptijd van 6 weken met Daltary. 1/3 deel van het totale aantal planten is geïnoculeerd met een lage concentratie FORL, en 1/3 met een hoge concentratie FORL, en 1/3 van de planten zijn niet besmet. De proef is uitgevoerd met een Dag/Nacht 9/15 uren, en een luchtvochtigheid D/N: 80%/68% met Full Spectrum licht (Rofienda, dichtst bij natuurlijk zonlicht)- 156 μmol licht/ m^2 . Gedurende de opkweek werd op het oog beoordeeld of bepaalde behandelingen minder groei vertoonden. Aan het eind van de proef werden de steenwolblokken van de plant opengesneden en werden ziektesymptomen aan de wortels gescoord, en werden de wortels uitwendig gesteriliseerd en uitgeplaat, om te verifiëren of de FORL in de plant aanwezig is.

4.4.3 Resultaten

De proef kon uiteindelijk 5.5 weken staan met 8 liter water. Dit is een indicatie dat de fractieproef in ieder geval genoeg fractie heeft om een opkweek van 5.5 weken te blijven staan. De planning om de planten een week vóór verspenen binnen te krijgen en te gaan behandelen, is in deze proef mis gegaan, omdat er geen rekening mee is gehouden dat de stekjes een week vervroegd zijn als ze niet geënt worden op onderstam (zoals hier het geval is). Bij de echte fractieproef, omdat deze een week voor verspenen al ingezet zal worden en de planten in klein stadium minder drinken, zou het kunnen dat de planten iets langer kunnen blijven staan.

FORL in hoge concentratie van 2 geteste doses beter, gebaseerd op de waargenomen symptomen in de wortel. Bij de het uitplaten van de wortel werd de aanwezigheid van FORL in beide doses aangetoond. Er was geen verschil in symptomen tussen de verschillende wortellexudaten behandelingen en de controle. OSL, CA en FA maken de plant niet significant weerbaarder tegen FORL.

4.5 +35

4.6 68Bio-assays

4.6.1 Inleiding

Volgend op de praktijkproeven bij het opkweek bedrijf waren er twee proeven, uitgevoerd in klimaatcellen.



Figuur 25. Planten van de exudatenproef, gerandomiseerd neergezet in de klimaatcel.

In de eerste vervolgprouf, de zgn. 'exudatenproef' werden 4 exudaten getest in twee verschillende doseringen en vergeleken met een controle, die alleen gietwater met tomatenvoeding kreeg. OSL is in deze proef weer meegenomen, hiernaast zijn de exudaten benzoëzuur, palmitinezuur en stearinezuur geselecteerd. Dit omdat deze exudaten in watermonsters van alle gewassen gemeten waren, benzoëzuur was van de op naam gebrachte fenolische zuren de meest voorkomende.

De benzoëzuur behandelingen zijn toegevoegd aan de helft van de planten zonder, en de helft van de planten met besmetting met *Fusarium oxysporum f. sp. radidis-lycopersici*.

In de tweede vervolgprouf (fractieproef) werden de fracties, zoals beschreven in het hoofdstuk Analyse Organisch Materiaal toegevoegd aan het gietwater met tomatenvoeding. Omdat het onmogelijk is alle moleculen uit het recirculatiewater van de drie teelten te identificeren, is er voor gekozen de moleculen in te delen via de manier waarop deze van elkaar te scheiden zijn. Zo zijn er per watersample verschillende subsamples gemaakt. Wanneer één fractie grotere invloed heeft dan een ander, kan eventueel verder gezocht worden binnen de betreffende fractie voor specifieke moleculen.

Doel van dit onderzoek is om vast te stellen of de teelt positief beïnvloed kan worden door het toevoegen van wortellexudaten. Enerzijds wordt naar de groei gekeken onder invloed van de wortellexudaten, en anderzijds naar de samenstelling van micro-organismen via Next Generation Sequencing (NGS). Hiernaast wordt gekeken of planten weerbaarder worden onder invloed van de toevoeging van bepaalde individuele (losse exudaten exudatenproef) of groepen exudaten (OSL en fractieproef).

4.6.2 Materiaal & Methode

4.6.2.1 Exudatenproef

Bij de exudaten proef zijn 20 planten per behandeling in de klimaatkamer gebruikt. De planten zijn gedurende de gehele proef ingegoten met bassinwater met tomatenvoeding, en een hoge of lage dosering van een bepaald exudaat. De behandelingen zijn een week voor de transplantatie op steenwol gestart. Na deze week zijn van alle planten de wortels geknipt, waarbij bij de helft van de planten (dus 10 per behandeling) *Fusarium oxysporum f. sp. radidis-lycopersici* sporensolutie (8×10^5) ingegoten werd.

Behandelingen: OSL, Benzoëzuur, Stearinezuur, Palmitinezuur, van iedere behandeling is helft planten geïnoculeerd met FORL, andere helft niet. De looptijd van de proef was 6

weken met cv. Daltary, Dag/Nacht 9/15 uren en luchtvochtigheid D/N: 80%/68% onder Full Spectrum lampen (Rofianda, dichtst bij natuurlijk zonlicht)- 156 μmol licht/ m^2 . Aan het eind van de opkweek werden alle planten per behandeling destructief gesampled en geanalyseerd op: groei (chlorofylgehalte 3x per plant, stengelgewicht, vers gewicht blad, drooggewicht blad, SLA (*specific leaf area*), bladoppervlak), uitplaten wortels voor bevestiging FORL in plant, hoofd- en sporenelementen. Daarnaast werden per behandeling 3 steenwolblokken opgestuurd naar KWR WaterInstituut voor DNA-analyse van de rhizosfeer door middel van Next Generation Sequencing (zie H5).

4.6.2.2 Fractieproef

Bij de fractieproef zijn 20 planten per behandeling in de klimaatkamer neergezet. De fracties zijn verdund naar de concentratie, waarin ze oorspronkelijk in het geanalyseerde water aanwezig waren en vervolgens toegevoegd aan standaard tomatenvoeding. Voor overzicht van de fractiebehandelingen, zie tabel 7. De ingietbehandelingen zijn een week voor de transplantatie op steenwol begonnen en zijn gedurende de gehele proef toegepast. Na de eerste week zijn tijdens het verspenen van alle planten de wortels geknipt, waarbij bij de helft van de planten (dus 10 per behandeling) *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) sporensolutie (8×10^5) ingegoten werd en de andere helft met normaal water. De 2k en 20K-behandelingen stonden in een aparte klimaatcel, wegens de ruimte die het hoge aantal behandelingen in beslag nam. Elke cel had een eigen controle. Ook van deze planten werd de helft met FORL behandeld en de andere helft niet. De looptijd van de proef was 6 weken, met tomaat cv. Daltary, Dag/Nacht: 9/15 en luchtvochtigheid D/N: 80%/68% onder Full Spectrum lampen (Rofianda, dichtst bij natuurlijk zonlicht)- 156 μmol licht/ m^2 .

Tabel 7. Een overzicht van de fracties gebruikt in de Bio-assay fractieproef. Alle fracties komen van samples bij Vereijken tomaat.

Klimaatcel 1	Code
Waterfractie drip 08-19	WF 27
Waterfractie drain 08-19	WF 28
Zuurfractie drip 08-19	AF 27
Zuurfractie drain 08-19	AF 28
Waterfractie drip 11-19	WF 5
Waterfractie drain 11-19	WF 6
Zuurfractie drip 11-19	AF 4
Zuurfractie drain 11-19	AF 5
Controle	Ctrl
Klimaatcel 2	
MW >2000 Da	2K
MW>20 000 Da	20K
Controle	Ctrl

4.6.3 Resultaten

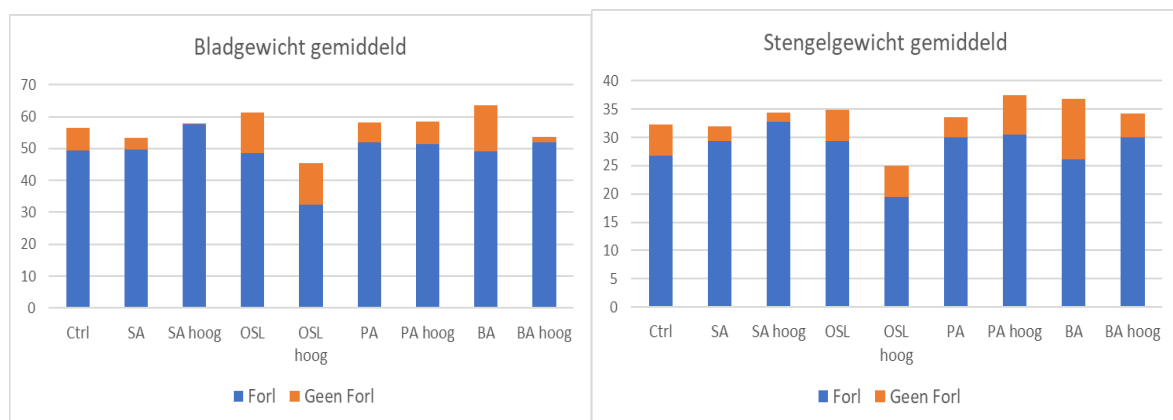
4.6.3.1 Exudatenproef

Stengel- en bladgewicht laten hetzelfde patroon zien. Een hoge dosering OSL geeft een significant lager blad- en stengelgewicht. Deze dosering is overigens 2,5x hoger dan de voorgeschreven dosis. De planten behandeld met een hoge dosis benzoëzuur heeft zowel in de top als halverwege de plant een significant lager chlorofylgehalte dan de controle en dan

de lage dosis benzoëzuur. Benzoëzuur kan dus leiden tot een afname van chlorofyl, maar deze afname vindt pas plaats als de hoeveelheid aanwezige benzoëzuur hoog genoeg is. Deze dosis ligt hoger dan het gehalte benzoëzuur dat gedurende het project in verschillende typen teelt gemeten is. De overige behandelingen met verschillende exudaten geven geen significant verschil in verschillende groeiparameters ten opzichte van de onbehandelde controle.

In de analyse van de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de wortels (KWR, zie bijlage), is te zien dat OSL de grootste verandering in microbensamenstelling teweeg brengt. Ook wordt aangetoond dat zowel inoculatie met *Fusarium* ($p=0.002$), exudaat toevoeging ($p=0.001$) en dosering van het wortel-exudaat ($p=0.004$) een significant effect hebben op de soortensamenstelling van de microbiële gemeenschap. Bij OSL en benzoëzuur-behandelde planten verandert de samenstelling van de microbiële gemeenschap niet significant onder invloed van FORL, bij de overige behandelingen wel.

Ook al is er een significante verandering in microbiële samenstelling onder invloed van FORL, qua groei is geen statistisch significante verandering te zien in planten geïnoculeerd met dit pathogeen.



Figuur 25 en 26. Respectievelijk het gemiddelde bladgewicht en stengelgewicht van de met FORL geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde tomatenplanten na zes weken exudaten behandeling (hoge en lage dosis). Behandelingen: ctrl (controle), SA (stearinezuur), OSL, PA (palmitinezuur), BA (benzoëzuur).

Uitplaatresultaten



Figuur 27. Links: wortels zonder schimmelgroei, rechts: wortels met FORL-uitgroei.

Geen van de toegevoegde exudaten voorkomt besmetting met FORL. Er was in de wortels geen verschil te zien in de heftigheid van de symptomen tussen verschillende behandelingen, er was ook geen verschil in de mate waarin FORL op plaat groeide tussen verschillende behandelingen. Geen van de behandelingen maakt de plant weerbaarder tegen FORL.

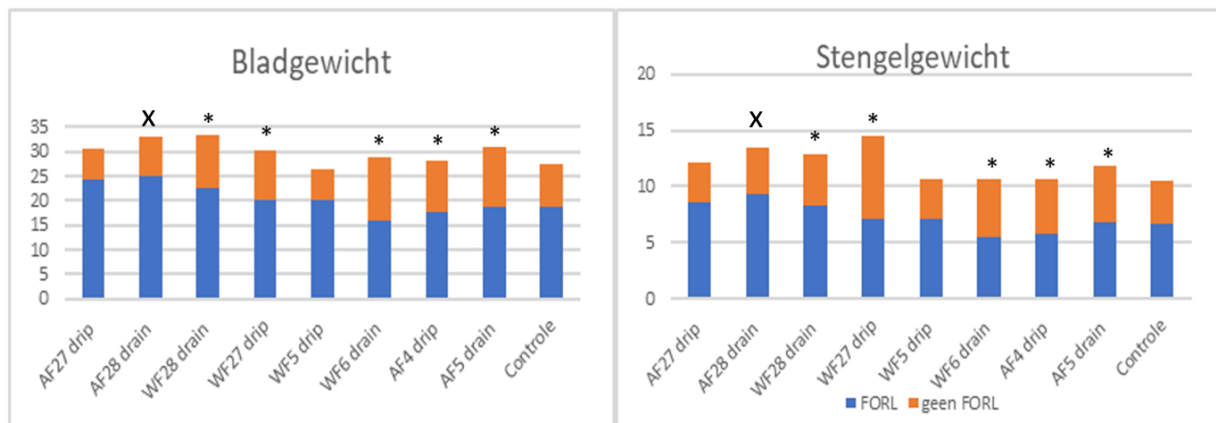
4.6.3.2 Fractieproef

In de fractieproef zijn het bladgewicht en stengelgewicht significant verhoogd o.i.v. de fractie "AF28 drain" ($p < 0.001$). Verder zijn zowel bladgewicht als stengelgewicht significant verlaagd in planten geïnoculeerd met FORL ($p < 0.001$). In figuren 28 en 29 is te zien, dat 5 van de 8 geteste fracties zorgen voor een significante afname in stengel- en bladgewicht onder invloed van FORL.

Bladoppervlak wordt significant beïnvloed door FORL-infectie, maar de behandelingen onderling laten geen significante effecten zien. Chlorofylgehalte wordt niet significant beïnvloed door de verschillende fractiebehandelingen, en laat ook geen effect zien n.a.v. de FORL-behandeling.

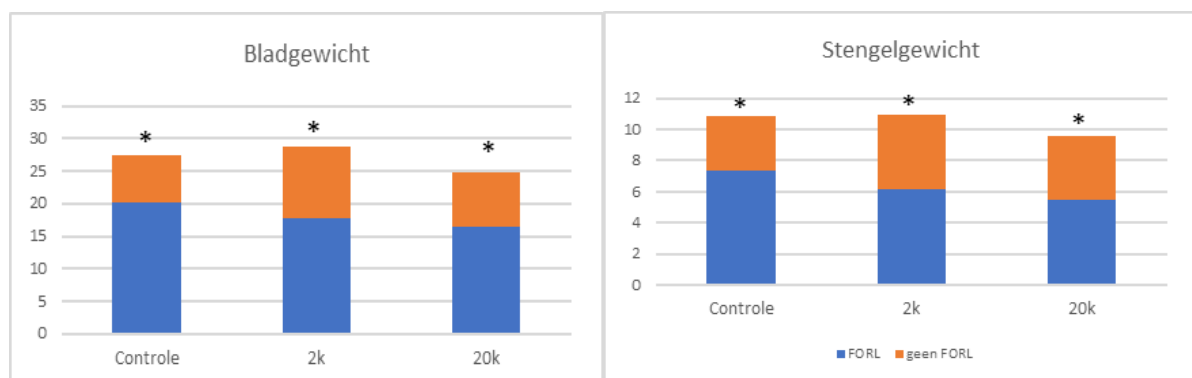
In de resultaten van de NGS-analyse van de samenstelling van de microbiële gemeenschap in de wortel van KWR (zie bijlage), is gevonden dat in de fractieproef de toediening van FORL een sterker effect (significant, $p = 0.001$) heeft op de samenstelling van deze microben, dan de toevoeging van fracties (geen significant effect gevonden). Dit komt overeen met de effecten van FORL op groei, die sterker zijn dan de effecten van fracties op groei.

In dit experiment had toevoeging van FORL een sterk effect op de samenstelling van de microbiële gemeenschap en een significant effect op plantengroei.



Figuur 28 en 29. Respectievelijk het gemiddelde bladgewicht en stengelgewicht van de met FORL geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde tomatenplanten na zes weken fractiebehandeling. De behandelingen die onder invloed van FORL een significante afname in blad- of stengelgewicht hebben, zijn gemarkeerd met *. De fractiebehandeling, die significant verhoogde groei laat zien, is gemarkeerd met X

In de proef van klimaatcel 2 zijn geen significante effecten gezien in groeiparameters onder invloed van de fractiebehandelingen. FORL zorgt wel voor een significante verlaging van blad- en stengelgewicht in alle behandelingen, inclusief de controle ($p < 0.001$ voor beide)



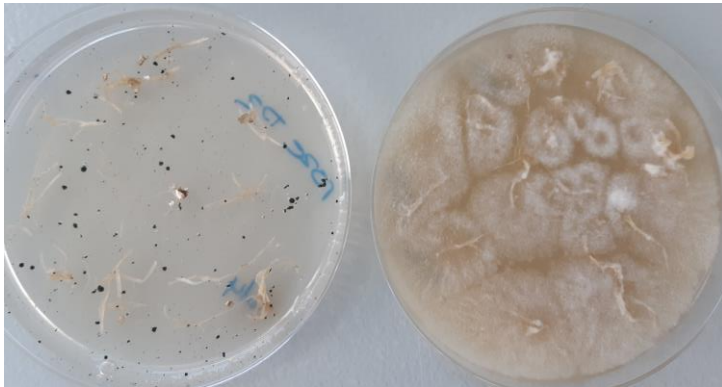
Figuur 30 en 31. Respectievelijk het gemiddelde bladgewicht en stengelgewicht van de met FORL geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde tomatenplanten na zes weken fractiebehandeling. De behandelingen die onder invloed van FORL een significante afname in blad- of stengelgewicht hebben, zijn gemarkeerd met *.

In de NGS-analyse van de microbiële gemeenschap in de wortels van de planten (KWR, zie bijlage) in klimaatcel 2, is te zien dat de samenstelling van de microbiële gemeenschap minder sterk verandert onder invloed van toevoeging van fusarium, op het moment dat de 2K of 20K fractie toegevoegd wordt aan de plant. Hierbij is de verandering verminderd in de 2K groep en het minst in de 20K groep. De verandering in microbiële gemeenschap door FORL is alleen significant bij de controle, en bij 20K en 2K niet. Ondanks deze verminderde verandering in microbiële samenstelling rond de wortels, is er nog steeds een significante groeivermindering onder invloed van FORL te zien bij beide fractiebehandelingen.

Uitplaatresultaten

FORL is aangetoond bij het uitplaten van alle FORL-geïnoculeerde behandelingen. Geen fractie voorkomt infectie met FORL. Ook wat betreft symptomen aan de wortels was er geen verschil te bemerken tussen planten behandeld met verschillende fracties.

Bij meerdere behandelingen waren ook *Trichoderma* spp. aangetoond zijn in het wortelmilieu.



Figuur 32. Links: *Trichoderma*-uitgroei uit de wortels van de proefplanten.

5 Invloed organisch stofdoseringen op de microbiologie rond tomatenplantwortels

Auteurs: Paul van der Wielen, Anthony Verschoor, Kimberly Learbuch

5.1 Inleiding

De tuinbouwsector heeft de ambitie de meest duurzame sector ter wereld te zijn. Belangrijke uitdaging hierbij is het efficiënter gebruiken van schaarse grondstoffen als fosfaat en zoet water, en het vermijden van emissies naar de omgeving. Glastuinbouwbedrijfssystemen bieden bij uitstek de mogelijkheid om een stap verder te zetten richting een circulaire tuinbouw. Meer dan 90% van de glastuinbouwbedrijven teelt los van de ondergrond, op substraat (bijv. steenwol, kokosvezel of potgrond) en recirculeert sinds het lozingsbesluit in 1994 al in meer of mindere mate het water (met daarin meststoffen en gewasbeschermingsmiddelen). Voor veel van de problemen zijn of worden oplossingen ontwikkeld maar vanwege belangrijke vragen en knelpunten rond de microbiële kwaliteit in het watersysteem, is een volledig gesloten kringloop voor veel telers nog te risicovol. De sector heeft echter met de overheid afgesproken naar een emissieloze tuinbouw in 2027 toe te werken. Daarnaast zijn glastuinbouwbedrijven per januari 2018 verplicht met een zuiveringsinstallatie gewasbeschermingsmiddelen uit het lozingswater te verwijderen, tenzij aangetoond kan worden dat er niet wordt geloosd (Activiteitenbesluit, www.infomil.nl). Dit zijn dringende redenen om de laatste knelpunten rond volledig gesloten telen op te lossen.

Het watersysteem in de tuinbouw is op te delen in i) water in de opslag en aanvoer (schoonwatersilo's, toevoerleidingen, druppelaars en andere watergeefsystemen), ii) water in het wortelmilieu (op en in de wortels, in het substraat), en iii) water in de afvoer, oftewel drainwater (goten, folies, vloeren, afvoerleidingen, vuilwatersilo's). In deze verschillende onderdelen van het watersysteem bevindt zich een grote diversiteit aan bacteriën, schimmels en virussen (ook wel microbiom genoemd), die mede dankzij de aanwezige voedingsstoffen (voor de planten) en organisch materiaal kunnen overleven en zich vermenigvuldigen. Het aanwezige microbiom zal waarschijnlijk per onderdeel van het watersysteem verschillen en kan afhankelijk van de soortensamenstelling zowel positieve als negatieve effecten hebben op de ontwikkeling van de planten en daarmee de teelt.

Zo is de afgelopen jaren in verschillende studies aangetoond dat ziektes bij teelt worden veroorzaakt door plantpathogenen die vóórkomen in het watersysteem. Door de overstap van grondgebonden-, naar los-van-de-grondsysteem kan een verschuiving plaatsvinden naar pathogenen die zich goed kunnen verspreiden in waterige milieus. Dit treedt in sommige gevallen op, ondanks het gebruik van desinfectiemiddelen voor het water. In dat laatste geval kan sprake zijn van groei van deze plantpathogenen in biofilm, omdat de biofilm bescherming biedt aan de ziekteverwekker tegen desinfectiemiddelen. Voorbeelden hiervan zijn de plantpathogenen *Fusarium* spp. en *Rhizobium rhizogenes*. In de sector is veel aandacht voor een verminderde inzet van gewasbeschermingsmiddelen (weerbaar telen), omdat het beschikbare beschermingsmiddelenpakket krimpt, minder nieuwe middelen beschikbaar komen, resistentie optreedt bij de organismen die ziekten en plagen veroorzaken, een wettelijke norm voor residu op producten is ingevoerd of omdat de chemische beschermingsmiddelen de planten kunnen verzwakken. Ook is er vanuit de consument een toenemende vraag naar "groene" producten zonder chemische beschermingsmiddelen.

Het water in de aanvoer is doorgaans gedesinfecteerd (bijv. met UV, ozon, verhitting, peroxide, chloor). Deze desinfectie zorgt voor een sterke reductie in het aantal micro-organismen, maar er zullen altijd micro-organismen zijn die na desinfectie nog levend aanwezig zijn en deze kunnen in het watersysteem overleven en/of groeien. Daarbij kunnen ze onder gunstige milieucondities een biofilm vormen in de leidingen van het irrigatiesysteem. Biofilm is een belangrijke oorzaak van verstoppingen van de druppelaars en vormt tevens een plek waar plantpathogene bacteriën, schimmels en virussen zich kunnen

vestigen en/of vermeerderen en daarmee kan de biofilm een belangrijke infectiebron zijn voor de teelt. De veelvuldig gebruikte desinfectiemiddelen die ingezet worden om biofilm te verwijderen, zullen ook een deel van de micro-organismen in het wortelmilieu afdoden en daardoor de bacteriesamenstelling in dit wortelmilieu veranderen. Het microbioom in het wortelmilieu wordt daarnaast beïnvloed door de directe omgeving, waaronder het substraat, de waterkwaliteit, aanwezige voedingsstoffen en wortellexudaten. Deze parameters hebben daarmee niet alleen direct maar ook indirect, via de relatie met het microbioom, een belangrijke rol bij de plantengroei, en dus productie en kwaliteit. Het is momenteel nog niet goed mogelijk om de microbiële waterkwaliteit voldoende effectief te monitoren en om het microbioom naar wens te sturen. Hierdoor wordt de doorontwikkeling naar emissieloze tuinbouw geremd. Voor duurzame, emissieloze productiesystemen is kennis over microbiële monitoring en sturing dus cruciaal.

Planten beïnvloeden de lokale microbiologie om de wortels (rhizosfeer) door bijvoorbeeld de secretie van exudaten uit de wortels (Huang et al. 2014). Wortellexudaten zijn o.a. vetzuren, suikers en eiwitten, stoffen die micro-organismen kunnen gebruiken voor groei. De basis voor deze exudaten is de opslag van koolstof uit de bovengrondse fotosynthese door de planten. Tot maar liefst 21% van het naar organisch stof omgezette koolstof uit fotosynthese kan worden uitgescheiden door wortels. Zodra de wortels de organisch stof uitscheidt, wordt het in natuurlijke bodems door micro-organismen omgezet. In een kunstmatige omgeving zoals in los-van-de-grondteelten produceren planten veel meer exudaten dan de micro-organismen in de directe omgeving van de wortel kunnen gebruiken, waardoor deze exudaten ophopen in het water in het teeltsysteem. Behalve dat deze exudaten door goede micro-organismen worden gebruikt, kunnen ook schadelijke organismen, zoals bv *Fusarium solani*, deze exudaten als voedingsbron opnemen. *F. solani* staat wereldwijd in de top drie van schimmels met de meeste economische schade. In een eerder TKI-onderzoek is duidelijk geworden dat wortellexudaten, en dan met name de hoeveelheid en samenstelling van organische verbindingen in het bassinwater, een cruciale factor is in de beïnvloeding van de microbiologische waterkwaliteit. De hoeveelheid en soort organische stof van de exudaten die door de plantenwortels worden uitgescheiden, bepalen in grote mate de samenstelling van de microbiologische gemeenschap in de waterstromen op het bedrijf. Door het reguleren van de concentratie en samenstelling van deze exudaten, de concentratie te verlagen of te verhogen, hetzij door de samenstelling te veranderen (laagmoleculair versus hoog moleculair, of gemakkelijk afbreekbaar versus moeilijk afbreekbaar), kan dus ook de microbiële waterkwaliteit worden gereguleerd. Het reguleren van deze stoffen kan worden gedaan door deze stoffen aan het gietwater te doseren, zodat het een toepassing is die gemakkelijk in een teeltsysteem kan worden ingepast. Hierdoor kan kennis op dit gebied direct leiden tot succesvolle aanpassingen bij substraatteelt en teelt op water. Om de invloed van het organische stof en/of specifieke exudaten op de microbiologie in de wortels rondom planten te achterhalen, is in een proefopstelling onderzocht wat de invloed van organische stofcondities is op de groei van planten. Daarbij lag de nadruk op het achterhalen hoe de bacteriegemeenschap verandert wanneer verschillende organische stofcomponenten aan het water worden toegevoegd. Naast deze organische stofcomponenten werd aan deel van de planten ook de plantpathogene schimmel *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) toegevoegd. Het doel van de dosering met FORL was om te achterhalen of het toevoegen van FORL de samenstelling van de bacteriegemeenschap in het wortelmilieu van de plant beïnvloedt en of het toedienen van bepaalde organische stofcomponenten de bacteriële gemeenschap robuuster maakt tegen FORL.

5.2 Materiaal & Methode

5.2.1 Opzet proeven

Er zijn twee studies uitgevoerd in klimaatkamers met tomatenplanten. In de eerste studie werden verschillende fracties gedoseerd aan tomatenplanten, zoals weergegeven in Tabel 2.1 en 2.2. In het eerste experiment van studie 1 werden de neutrale fractie en zuurfractie van de laagmoleculaire organische stoffractie (< 2 kDa) gedoseerd die afkomstig waren uit

de druppelaars (drip) en waterafvoer (drains) van het watersysteem in een kas op een praktijklocatie waar tomaten werden gekweekt (Tabel 8). Deze experimenten zijn tweemaal uitgevoerd, namelijk in augustus en november 2019. In het tweede experiment van studie 1 werd ook water gedoseerd met twee andere organische stof fracties: de ene fractie bevatte daarbij organische moleculen groter dan 2.000 Da (> 2 kDa) en de andere fractie bevatte organische stofmoleculen groter dan 20.000 kDa (> 20 kDa) (Tabel 2.2). Bij beide experimenten werd een controle zonder dosering meegenomen en aan de ene helft werd *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) toegevoegd; aan andere helft werden geen verdere toevoegingen gedaan.

In de tweede studie werden drie afzonderlijke verschillende exudaten (stearinezuur, palmitinezuur en benzoëzuur) of het OSL®-product toegevoegd aan tomatenplanten zoals schematisch weergegeven in Tabel 2.3. Het OSL®-product bevat een mix van verschillende organische stoffen, de exacte samenstelling hiervan is niet openbaar. De verschillende exudaten en het OSL® product werden in hoge en lage concentratie gedoseerd aan de tomatenplanten, waarbij aan de ene helft ook FORL werd gedoseerd.

Tabel 8. Schematische weergave van de experimentele opzet van het eerste experiment van studie 1.

Monster	Datum	Fractie < 2kDa	Locatie	Toevoeging FORL	# Planten
1.1.1	08-2019	Neutraal	Drain	+ FORL	3
1.1.2	08-2019	Neutraal	Drain	- FORL	3
1.1.3	08-2019	Neutraal	Drip	+ FORL	3
1.1.4	08-2019	Neutraal	Drip	- FORL	3
1.1.5	08-2019	Zuur	Drain	+ FORL	3
1.1.6	08-2019	Zuur	Drain	- FORL	3
1.1.7	08-2019	Zuur	Drip	+ FORL	3
1.1.8	08-2019	Zuur	Drip	- FORL	3
1.1.9	11-2019	Neutraal	Drain	+ FORL	3
1.1.10	11-2019	Neutraal	Drain	- FORL	3
1.1.11	11-2019	Neutraal	Drip	+ FORL	3
1.1.12	11-2019	Neutraal	Drip	- FORL	3
1.1.13	11-2019	Zuur	Drain	+ FORL	3
1.1.14	11-2019	Zuur	Drain	- FORL	3
1.1.15	11-2019	Zuur	Drip	+ FORL	3
1.1.16	11-2019	Zuur	Drip	- FORL	3
Controle	11-2019	Geen	Geen	+ FORL	3
Controle	11-2019	Geen	Geen	- FORL	3

Tabel 9. Schematische weergave van de experimentele opzet van het tweede experiment van studie 1.

Monster	Org. stof fractie	Toevoeging FORL	# Planten
1.2.1	> 2 kDa	+ FORL	3
1.2.2	> 2 kDa	- FORL	3
1.2.3	> 20 kDa	+ FORL	3
1.2.4	> 20 kDa	- FORL	3
Controle	Geen	+ FORL	3
Controle	Geen	- FORL	3

Tabel 10. Schematische weergave van de experimentele opzet van studie 2.

Monster	Dosering	Hoeveelheid	Toevoeging FORL	# Planten
2.1	Stearinezuur (exudaat 1)	Hoog	+ FORL	3
2.2	Stearinezuur (exudaat 1)	Hoog	- FORL	3
2.3	Stearinezuur (exudaat 1)	Laag	+ FORL	3
2.4	Stearinezuur (exudaat 1)	Laag	- FORL	3
2.5	Palmitinezuur (exudaat 2)	Hoog	+ FORL	3
2.6	Palmitinezuur (exudaat 2)	Hoog	- FORL	3
2.7	Palmitinezuur (exudaat 2)	Laag	+ FORL	3
2.8	Palmitinezuur (exudaat 2)	Laag	- FORL	3
2.9	Benzoëzuur (exudaat 3)	Hoog	+ FORL	3
2.10	Benzoëzuur (exudaat 3)	Hoog	- FORL	3
2.11	Benzoëzuur (exudaat 3)	Laag	+ FORL	3
2.12	Benzoëzuur (exudaat 3)	Laag	- FORL	3
2.13	OSL®	Hoog	+ FORL	3
2.14	OSL®	Hoog	- FORL	3
2.15	OSL®	Laag	+ FORL	3
2.16	OSL®	Laag	- FORL	3
Controle	Geen	Geen	+ FORL	3
Controle	Geen	Geen	- FORL	3

5.3 Monsternamen en DNA-analyse

5.3.1 Monsternamen

Na dosering van de verschillende fracties met of zonder FORL werden de planten geïncubeerd in de proefkas. Na deze incubatie werden monsters genomen om de samenstelling van de bacteriepopulatie te bepalen met behulp van DNA-analyses. Hiervoor werden per behandeling en per plant vier monsters uit het substraat waar de plant op groeide genomen, twee dichtbij de wortels en twee verder weg van de wortels. Deze vier monsters werden gepoold in een monsterfles met 50 ml steriel water. De bacteriën werden met behulp van sonicatie losgetrild, zodat ze in de waterfase terecht komen. De watermonsters werden gefiltreerd over een 0,2 µm filter, waarna het filter werd toegevoegd aan een buffer, zodat de monsters kunnen worden opgeslagen in de vriezer (-20°C) totdat het DNA werd geïsoleerd.

5.3.2 DNA isolatie

De in de vriezer opgeslagen filters werden ontdooid en het DNA werd vervolgens uit deze filters geïsoleerd met de DNeasy PowerBiofilm kit (Qiagen). Deze DNA isolatie is uitgevoerd conform KWR-huisvoorschrift LMB-069.

5.3.3 PCR en sequentieanalyse van het 16S rRNA gen van bacteriën

Gebarcodeerde fragmenten van het 16S rRNA gen (~300bp) werden verkregen door de V4 regio van het 16S rRNA gen met primers 515F en 806R te amplificeren in een PCR-reactie (Caporaso et al. 2011) met het DNA geïsoleerd van ieder monster en van negatieve controles (blanco van DNase/RNase vrij water tijdens filtratie en tijdens PCR). De PCR producten zijn opgeschoond, waarna de DNA-sequentie van de gezuiverde PCR producten is bepaald met de Illumina MiSeq sequencer bij KWR.

De verkregen DNA-sequenties zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van het specialistische pipelineprogramma Mothur. Dit programma zorgt voor verbetering van de sequentiedata door eerst een aantal stappen uit te voeren waarin eventuele fouten uit de sequentiedata worden verwijderd, vervolgens wordt een programma toegepast waarmee chimere sequenties (artefacten die t.g.v. de PCR-reacties kunnen ontstaan) worden verwijderd. Na deze verbeteringsstappen worden de 16S rRNA gensequenties ingedeeld in "Operational Taxonomic Units" (OTU's) waarbij alle 16S rRNA gensequenties met een sequentieovereenkomst van minimaal 97% ingedeeld worden tot één OTU. Ten slotte gaat het programma in een referentie sequentiedatabase (Silva v128-V4) op zoek naar 16S rRNA gensequenties van geïdentificeerde bacteriën die overeenkomen met de sequenties van de OTU's uit de dataset en gebruikt deze vergelijking voor taxonomische identificatie van de 16S rRNA gensequenties van de bacteriën. Het taxonomisch niveau waarop de sequentie op naam kan worden gebracht hangt af van de aanwezigheid van overeenkomende sequenties in de referentiedatabase. Indien op bijvoorbeeld bacterieel genustniveau een overeenkomende referentie sequentie ontbreekt, maar op bacterieel familieniveau wel een overeenkomende referentie sequentie aanwezig is, dan zal de uit het monster verkregen bacteriële sequentie op genustniveau als "onbekend/unclassified" worden getypeerd, maar op familieniveau wel tot een familienaam kunnen worden benoemd. De betrouwbaarheid en volledigheid van deze fylogenering hangt dus mede af van de beschikbare referentiedatabase. Voor het geanalyseerde 16S rRNA genfragment is de referentiedatabase groot, waardoor de identificatie van de sequenties betrouwbaar is. Identificatie tot genustniveau is desondanks toch vaak niet mogelijk door het (nog) ontbreken van overeenkomende geïsoleerde en beschreven bacteriesoorten in de database. Daarnaast is het geanalyseerde stuk 16S rRNA gen te kort om de sequenties tot bacterieel soortniveau in te kunnen delen.

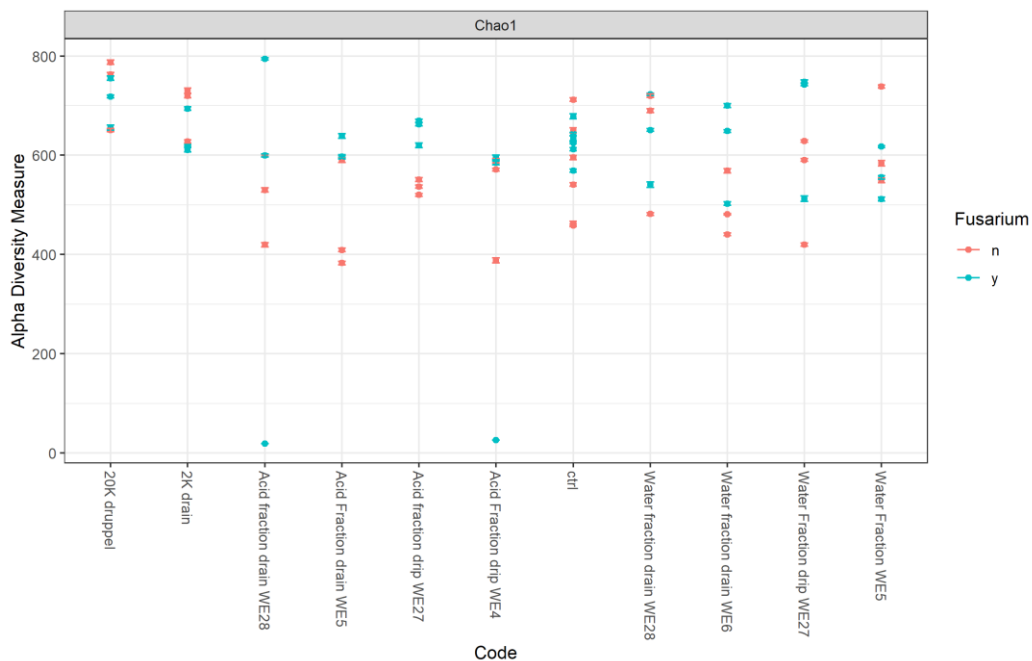
De uitgewerkte sequentiedata die werd verkregen na toepassing van Mothur, werden vervolgens gebruikt om de verschillen in taxonomische indeling en OTU-samenstelling tussen de monsters te visualiseren. Er werden staafdiagrammen gemaakt waarin de taxonomische indeling op Klasseniveau tussen monsters kunnen worden vergeleken. Tevens werd de diversiteit van de bacteriegemeenschap bepaald door de Chao diversiteitsparameter te berekenen. Tevens werden de verschillen tussen de OTU-samenstelling van de monsters bepaald door de Bray-Curtis similarity distances matrix te berekenen. Deze matrix is vervolgens gebruikt als input voor een principle coordinates analysis (PCoA)-achtige analyse genaamd canonical analysis of principal coordinates (CAP) analyse. Een PCoA is een manier om de verschillen in soortensamenstelling van de bacteriegemeenschap van de individuele monsters te visualiseren (in dit geval des te dichter monsters bij elkaar liggen, des te minder de bacteriesamenstelling verschillen). Daarbij wordt bij de x- en y-as aangegeven welk percentage van de variatie wordt verklaard door de x- versus y-as. De CAP-analyse berekent ook nog de invloed van ieder ingevoerde factor (bijvoorbeeld wel of niet doseren van FORL, doseren van verschillende organische stof fracties) en geeft iedere factor in de grafiek weer met een pijl. Des te langer de pijl, des te sterker de invloed van deze factor. Tevens werd met permutational multivariate analysis of variance

(PERMANOVA) statistisch getoetst welke factoren de verschillen tussen monsters verklaren. Al deze analyses werden uitgevoerd in het statistisch computerprogramma R.

5.4 Resultaten en discussie

5.4.1 Studie 1: dosering van organische stoffracties met verschillende molecuulgrootte

De diversiteit van de bacteriegemeenschap is berekend met de Chao1 parameter en deze zegt iets over de hoeveelheid bacteriesoorten die in het monster aanwezig zijn en de verdeling van de sequenties over deze bacteriesoorten. Deze parameter geeft een lage waarde voor een monster wanneer er (i) weinig bacteriesoorten zijn, of (ii) veel bacteriesoorten zijn, maar de sequenties behoren voornamelijk tot een paar bacteriesoorten. Een hoge waarde wordt verkregen wanneer er veel bacteriesoorten zijn en de 16S rRNA gensequenties evenredig over deze bacteriesoorten zijn verdeeld. De diversiteit van de monsters uit studie 1 is weergegeven in Figuur 33. Deze figuur laat zien dat over het algemeen de diversiteit tussen de monsters niet veel verschilt. Wel is de spreiding in de diversiteit tussen de monsters van een behandeling groter voor de planten waar de neutrale en zuurfracties van de laagmoleculaire organische stoffractie uit de druppelaar (drip) en waterafvoer (drain) aan zijn gedoseerd dan voor de planten die een dosering met de hoger moleculaire organische stoffracties (> 2 kDa en > 20 kDa) hebben gekregen. Daarnaast lijkt bij de zuurfractiedoseringen de diversiteit van de bacteriegemeenschap wanneer FORL niet werd gedoseerd lager te zijn dan wanneer FORL wel werd gedoseerd. Bij de dosering van de zuurfractie van de drain in augustus 2019 (acid fraction drain WE28) en van de zuurfractie van de drip in november 2019 (acid fraction drain WE4) werd echter een afwijkende zeer lage diversiteit gevonden. Er zijn geen verklaringen voor deze afwijkingen, maar mogelijk dat tijdens de DNA-isolatie, PCR of DNA-sequensen iets verkeerd is gegaan. Daarom zijn deze twee monsters weggelaten in de verdere analyses.

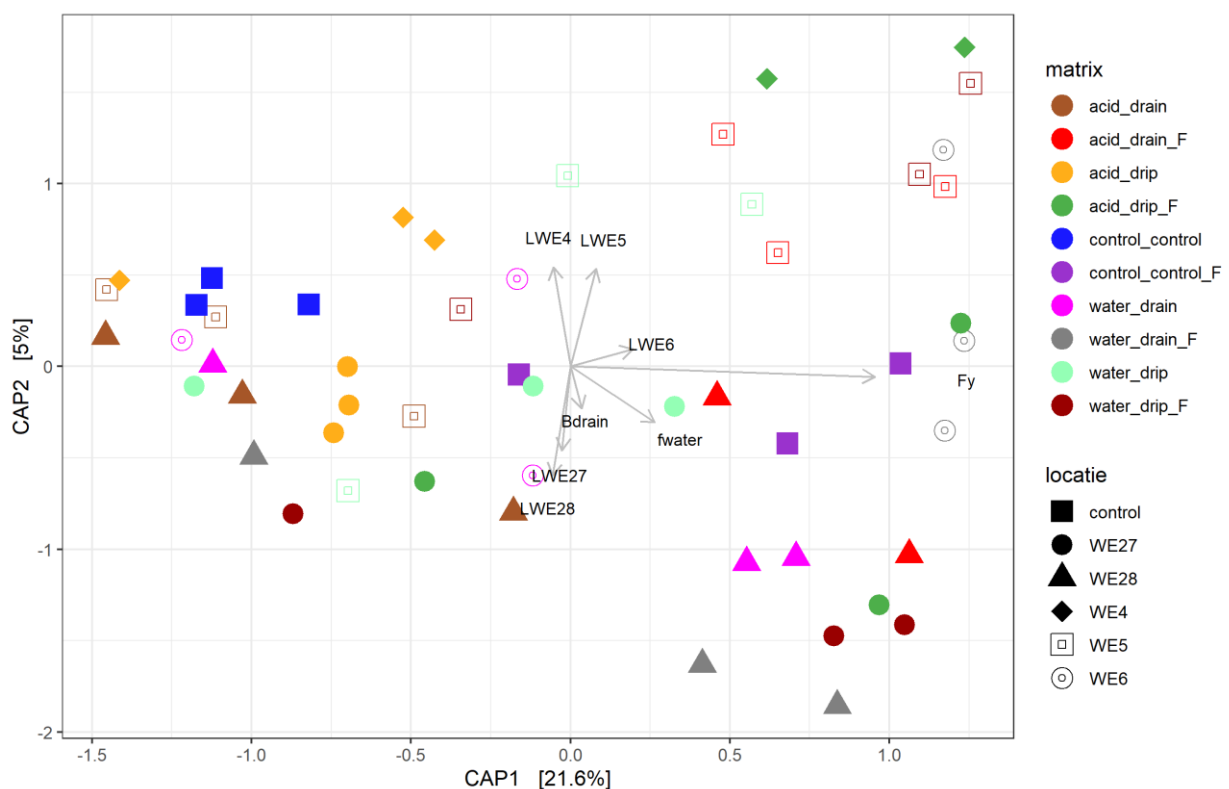


Figuur 33. De diversiteit van de bacteriegemeenschap rond de wortelen van tomatenplanten waaraan verschillende organische stoffracties zijn toegevoegd. 20K druppel is organisch stoffractie > 20 kDa uit de druppelaar, 2K drain is organisch stoffractie >2 kDa uit de afvoer (drain), acid fraction de zuurfractie < 2 kDa en water fraction de neutrale fractie < 2 kDa.

5.4.2 Experiment 1: Effect op de bacteriegemeenschap van dosering neutrale en zuurfractie van laagmoleculair organisch stof uit drip en drain van praktijklocatie

Doordat de doseringen van de organische stoffracties > 2kDa en > 20 kDa op een ander moment zijn uitgevoerd dan de doseringen met de neutrale en zuurfracties van het laagmoleculaire organisch stof (< 2kDa), is er voor gekozen om de vergelijking van de bacteriegemeenschappen tussen de verschillende doseringen per experiment te beschrijven.

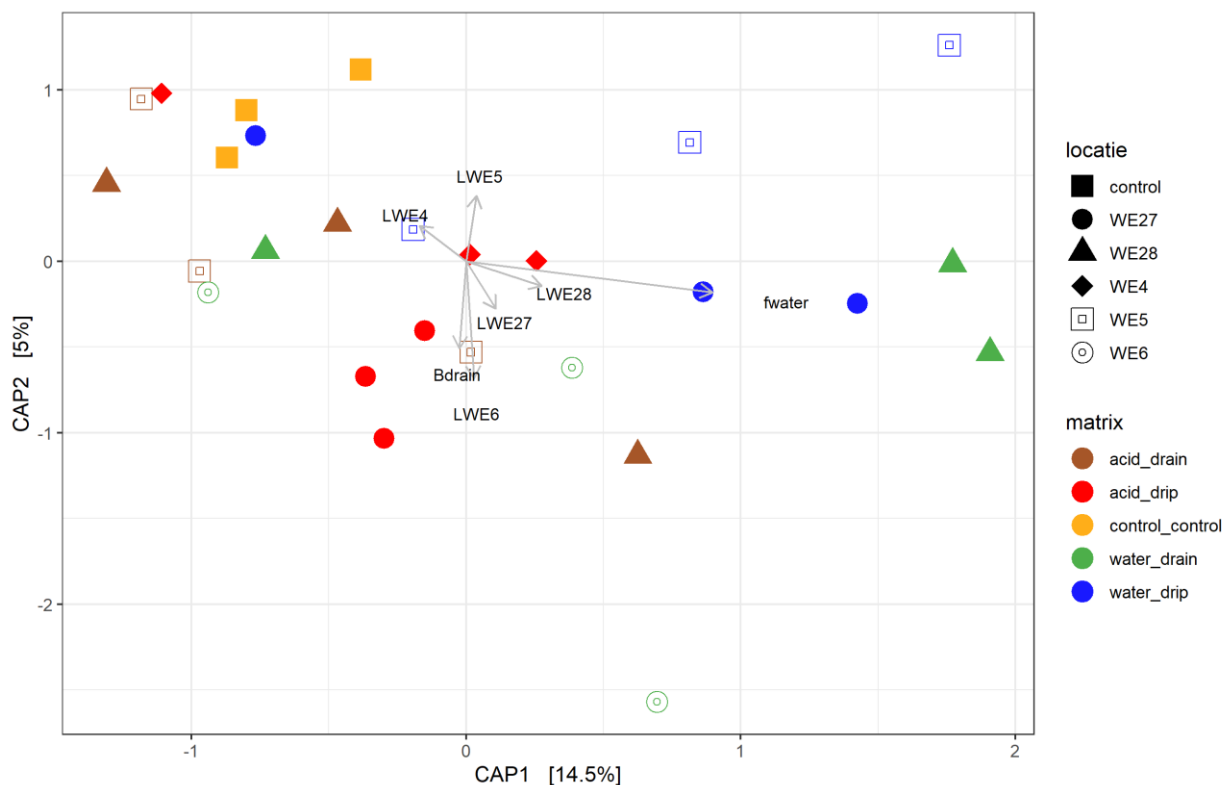
In Figuur 34 zijn in een PCoA-achtige omgeving de verschillende monsters weergegeven. De positie die de monsters ten opzichte van elkaar hebben is daarbij bepaald aan de hand van de samenstelling van de bacteriegemeenschap op OTU-niveau. Wanneer de monsterpunten in deze figuur dicht bij elkaar staan, betekent het dat de samenstelling van de bacteriegemeenschap vergelijkbaar is. Wanneer de monsterpunten ver van elkaar verwijderd zijn, betekent het dat de samenstelling van de bacteriegemeenschap veel van elkaar verschilt. Het is opvallend in deze figuur dat de monsters rond de wortels waar FORL aan is gedoseerd voornamelijk aan de rechterkant liggen en de monsters rond de wortels waar FORL niet aan is gedoseerd aan de linkerkant. Dit betekent dat de bacteriesamenstelling rond de wortels waar FORL aan is gedoseerd afwijkt van de bacteriesamenstelling rond de wortels waar FORL niet aan is gedoseerd. De statistische PERMNAOVA toets geeft ook als resultaat dat de dosering van FORL een significante factor is op de bacteriesamenstelling rond de wortels ($p < 0,05$). Er kan daarom worden geconcludeerd dat FORL de bacteriesamenstelling rond de wortels significant beïnvloedt, maar uit de gegevens kan niet worden gehaald welke mechanismen hier aan ten grondslag liggen.



Figuur 34. Vergelijking van de bacteriesamenstelling van ieder monsterpunt middels een PcoA-achtige plot. Acid is zuurfractie < 2 kDa, water is neutrale fractie < 2kDa, drip is water uit de druppelaar, drain is water uit de afvoer, F is toevoeging van FORL. WE27- en WE28-monsters zijn genomen in augustus 2019. WE4-, WE5- en WE6-monsters zijn genomen in november 2019.

Tevens clusteren de monsters van het experiment uitgevoerd in augustus 2019 bij elkaar en apart van de monsters van het experiment uitgevoerd in november 2019, die ook bij elkaar clusteren (Figuur 34). Deze tijdsfactor is echter niet significant ($p > 0,05$). Er zijn geen clusteringen of significante effecten waargenomen van de neutrale fracties van het laagmoleculaire organisch stof versus de zuurfracties van het laagmoleculair organische stof versus control of fracties afkomstig van de drip versus drain versus controle.

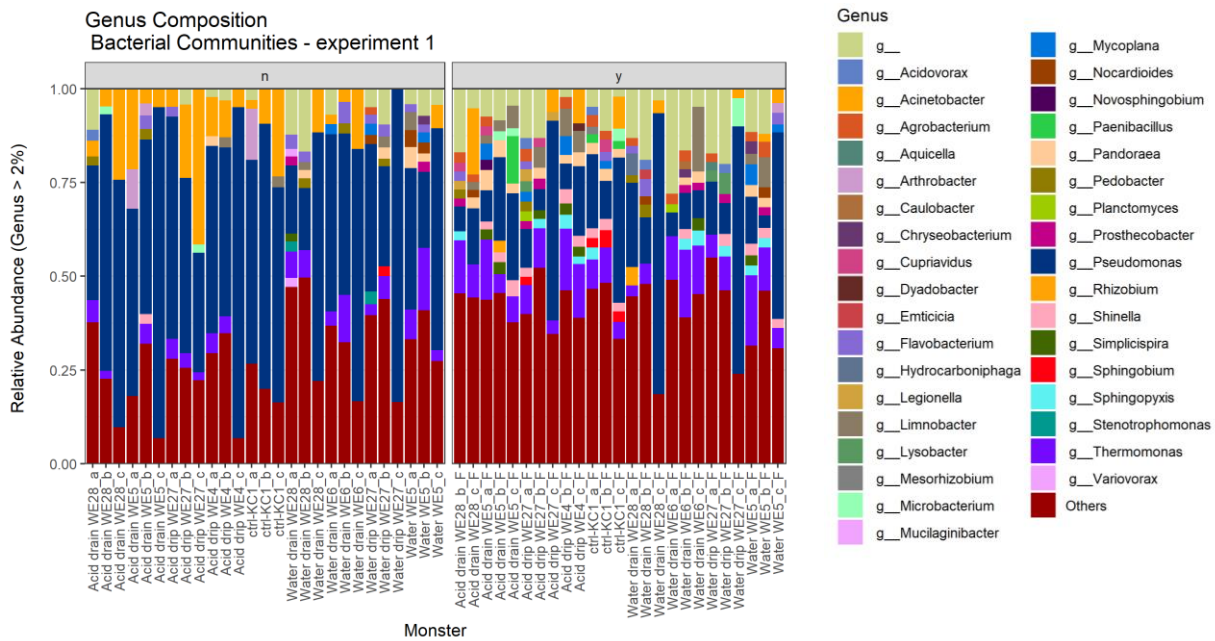
Doordat de invloed van de dosering van FORL op de bacteriegemeenschap zo sterk was, is de vergelijking van de samenstelling van de bacteriegemeenschap tussen de monsters herhaald, maar dan zonder de monsters waar ook FORL aan is gedoseerd (Figuur 35). Uit deze figuur blijkt dat de meeste monsters waar de neutrale fractie van het laagmoleculaire organische stof aan is gedoseerd aan de rechterkant liggen, terwijl de controle en de monsters waar de zuurfractie van het laagmoleculaire organische stof aan is gedoseerd in het midden of aan de linkerkant liggen. Uit de statistische analyse met PERMANOVA volgde ook dat de neutrale versus zuurfractie een significante factor ($p < 0,05$) is in de verklaring van de verschillen in de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de tomatenplantwortels waar de neutrale en zuurfractie van het laagmoleculaire organische stof aan is gedoseerd. De herkomst van de fractie (drip of drain) was geen significante factor ($p > 0,05$) die de samenstelling van de bacteriegemeenschap bepaalt.



Figuur 35. Vergelijking, middels een PcoA-achtige plot, van de bacteriesamenstelling van alle monsters waar geen FORL aan is gedoseerd. Acid is zuurfractie < 2 kDa, water is neutrale fractie < 2 kDa, drip is water uit de druppelaar, drain is water uit de afvoer. WE27- en WE28-monsters zijn genomen in augustus 2019. WE4-, WE5- en WE6-monsters zijn genomen in november 2019.

Doordat werd waargenomen dat de dosering van FORL leidde tot een significant andere bacteriesamenstelling op OTU-niveau vergeleken met monsters waar geen FORL aan werd toegevoegd, is tot slot onderzocht of de toevoeging van FORL bij de monsters resulteerde in de toe- of afname van sommige beschreven bacteriegenera (Figuur 36). De monsters rond wortels waaraan FORL is gedoseerd bevatten over het algemeen meer bacteriën die

behoorde tot het genus *Thermomonas*, maar minder bacteriën die behoorde tot het genus *Pseudomonas* en *Acinetobacter*. Hieruit wordt dus geconcludeerd dat de toevoeging van FORL aan de tomatenplanten met name de groei van *Pseudomonas*- en *Acinetobacter*-bacteriën remt in de wortelzone, terwijl de groei van *Thermomonas*-bacteriën wordt gestimuleerd. Tevens werd waargenomen dat het aantal verschillende genera dat meer dan 2% aanwezig was in de bacteriepopulatie groter was bij de monsters waar FORL aan was gedoseerd dan bij de monsters waar geen FORL aan was gedoseerd.



Figuur 36. De bacteriesamenstelling op genusniveau tussen monsters rond tomatenplantwortels waar FORL niet aan is toegevoegd (links) en waar FORL wel aan is toegevoegd (rechts). Hierbij worden alleen de meest dominante genera weergegeven (>2% van de bacteriepopulatie in een monster), de recessieve genera zijn samengebracht in de kleurbalk "others". Acid is zuurfractie < 2 kDa, water is neutrale fractie < 2kDa, drip is water uit de druppelaar, drain is water uit de afvoer.

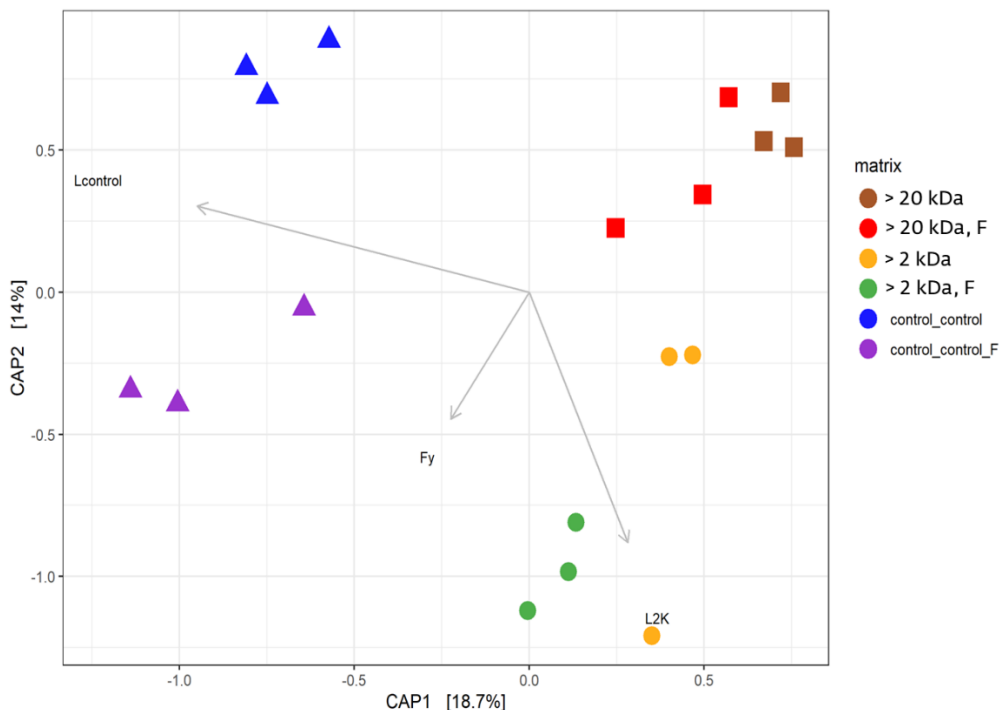
Uit de resultaten van het eerste experiment van studie 1 kan worden geconcludeerd dat het doseren van FORL aan tomatenplanten een significante en sterke invloed heeft op de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van tomatenplanten, waarbij met name de groei van *Pseudomonas*, *Acinetobacter* en *Thermomonas* worden beïnvloed. Daarnaast lijkt het doseren van de neutrale fractie van het laagmoleculair organisch stof (< 2 kDa) uit de druppelaars of waterafvoer van een praktijklocatie ook een significant, maar minder sterk, effect te hebben op de bacteriegemeenschap rond wortels van tomatenplanten in vergelijking tot de controle of tomatenplanten waar de zuurfractie van de laagmoleculaire organische stof aan is gedoseerd.

5.4.3 Experiment 2: effect doseringen organische stoffracties > 2 kDa en > 20 kDa op de bacteriegemeenschap

De samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van tomatenplanten waar verschillende organische stoffracties (> 2 kDa en > 20 kDa) aan werden toegevoegd, zijn ook met elkaar en de controle vergeleken en de resultaten daarvan zijn gevisualiseerd in een PCoA-achtige figuur (Figuur 37). Uit deze figuur volgt dat rond de wortels de bacteriesamenstelling van de controlemonsters afwijken van de bacteriesamenstelling van

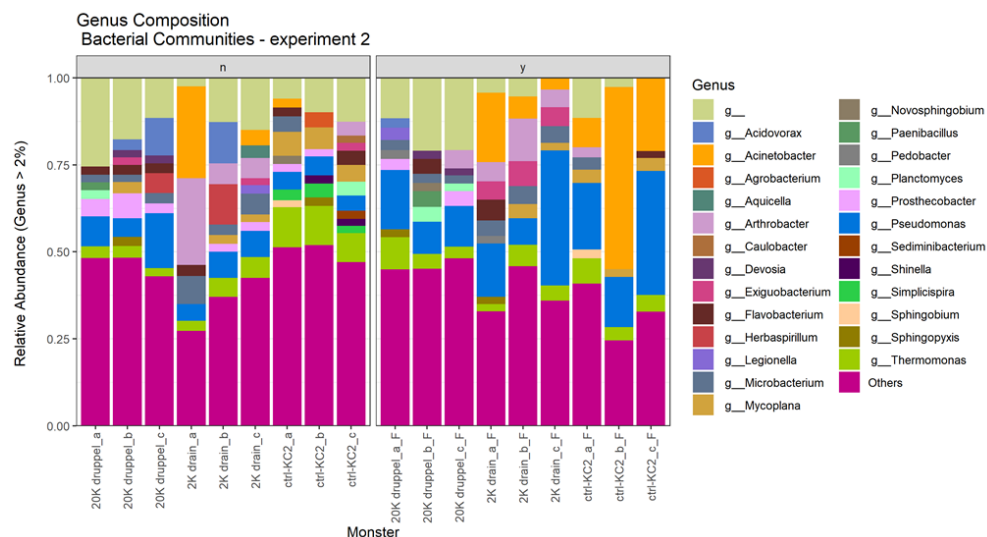
de monsters waar een organische stoffractie aan toe is gevoegd. Tevens clusteren de monsters waar een hoogmoleculaire organische stoffractie (> 20 kDa) apart van de monsters waar een middel moleculaire organische stoffractie (> 2 kDa) aan is toegevoegd. De PERMANOVA-analyse liet zien dat de verschillen in bacteriesamenstelling rond de wortels tussen de controlemonsters en monsters waaraan de organische stoffracties zijn toegevoegd significant waren ($p < 0,05$). Tevens werden significante verschillen ($p < 0,05$) waargenomen tussen de bacteriesamenstelling rond de wortels waar > 20 kDa fractie aan toe was gevoegd en rond de wortels waar > 2 kDa fractie aan toe was gevoegd.

De resultaten laten verder zien dat de controleplanten waar ook FORL aan was toegevoegd los clusterde van de controleplanten waar geen FORL aan was toegevoegd. Voor de planten waar ook een organische stoffractie aan werd gedoseerd, was het verschil in bacteriesamenstelling rond de wortels minder duidelijk. De resultaten van de statistische PERMANOVA-toets lieten zien dat de bacteriesamenstelling tussen planten waar FORL aan was toegevoegd en planten waar FORL niet aan was toegevoegd alleen significant verschilde voor de controleplanten ($p < 0,05$), maar niet voor de planten waar ook een organische stoffractie aan was gedoseerd ($p > 0,05$).



Figuur 37. *Vergelijking, middels een PCoA-achtige plot, van de bacteriesamenstelling rond wortels van tomatenplanten waar niets aan is gedoseerd (controle) of waar een hoogmoleculaire organische stoffractie (> 20 kDa) en een laagmoleculaire organische stoffractie (> 2 kDa) is gedoseerd. 2K is organische stoffractie > 2 kDa, 20K is organische stoffractie > 20 kDa, drip is water uit de druppelaar, drain is water uit de afvoer, F is toevoeging van FORL.*

Doordat werd waargenomen dat de dosering van een middel- en hoogmoleculaire organische stoffractie leidde tot een significant andere bacteriesamenstelling op OTU-niveau vergeleken met de controle, is tot slot onderzocht of de toevoeging van deze organische stoffracties resulteerde in de toe- of afname van sommige beschreven bacteriegenera (Figuur 38). Er werden echter geen genera geïdentificeerd die duidelijk meer of minder aanwezig waren in de behandelde monsters dan in de controlemonsters.

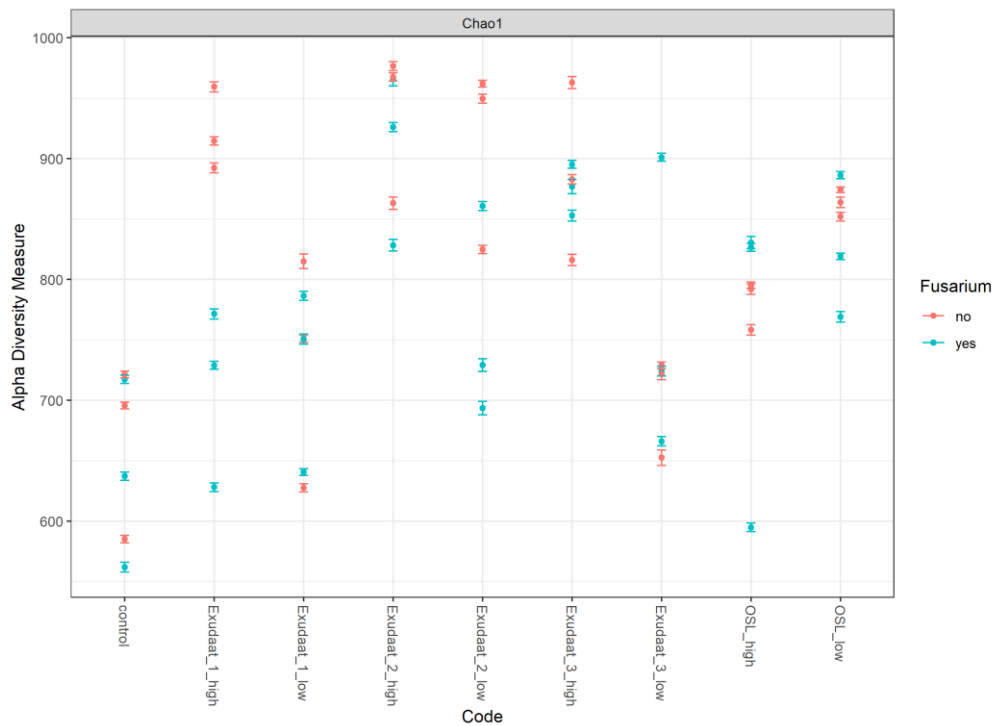


Figuur 38. De bacteriesamenstelling op genusniveau tussen monsters rond tomatenplantwortels waar organische stoffracties (> 20kDa en > 2 kDa) aan zijn toegevoegd en de controleplanten. Hierbij worden alleen de meest dominante genera weergegeven, de recessieve genera zijn samengebracht in de kleurbalk "others". 2K is organische stoffractie > 2 kDa, 20K is organische stoffractie > 20 kDa, drip is water uit de druppelaar, drain is water uit de afvoer, F is toevoeging van FORL.

Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat het toevoegen van een middel- of hoogmoleculaire organische stoffractie aan tomatenplanten een significante invloed hebben op de bacteriegemeenschap rond de wortels van deze tomatenplanten. Daarnaast beïnvloedt FORL de bacteriegemeenschap rond de wortels niet significant wanneer daarnaast ook deze organische stoffracties aan de planten worden gedoseerd. Dit betekent dat de dosering van organische stoffracties > 2kDa of > 20 kDa resulteert in een robuuste bacteriegemeenschap waarop de gedoseerde FORL geen invloed heeft. De resultaten van deze analyses geven geen inzicht in de achterliggende mechanismen die ervoor zorgen dat FORL de bacteriegemeenschap niet beïnvloedt wanneer deze organische stoffracties aanwezig zijn. Tevens wordt niet duidelijk welke organische stoffen in de middel- en hoogmoleculaire fracties verantwoordelijk zijn voor dit effect.

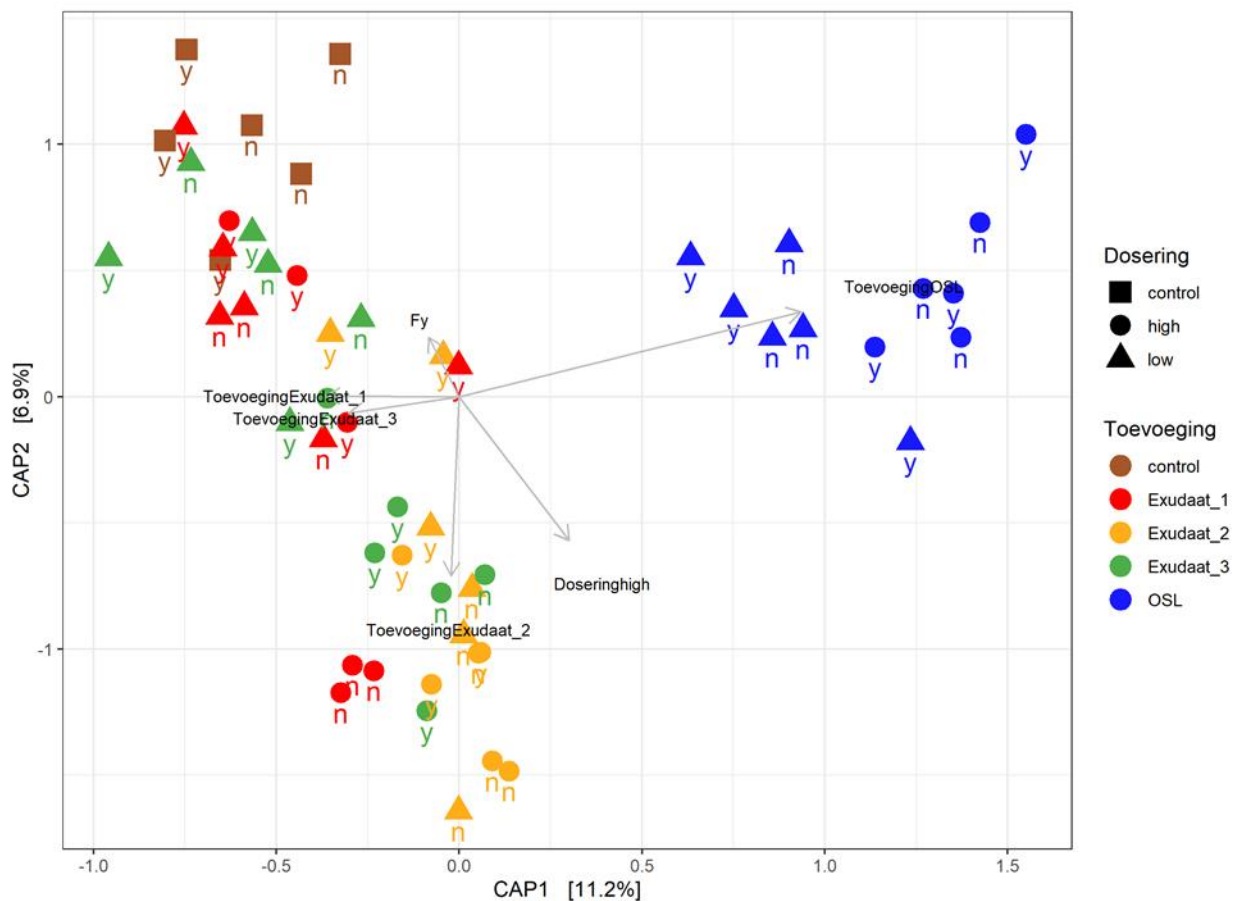
5.4.4 Studie 2: dosering van specifieke exudaten en OSL®

De diversiteit van de bacteriegemeenschap in monsters rond de wortels van tomatenplanten waar drie specifieke exudaten of OSL® aan zijn gedoseerd, is weergegeven in Figuur 39. De bacteriële diversiteit was het hoogst in de monsters rond wortels van tomatenplanten waar een exudaat in hoge concentratie aan werd toegevoegd. Daarbij viel op dat bij de dosering van hoge concentratie stearinezuur (exudaat 1) de bacteriegemeenschap minder divers was wanneer ook FORL werd gedoseerd. Bij dosering van hoge concentratie palmitinezuur of benzoëzuur werd dit verschil tussen wel of geen dosering van FORL niet waargenomen. Bij een lage dosering van een exudaat was de bacteriële diversiteit rond de wortels vergelijkbaar met die van de controle zonder dosering. De bacteriële diversiteit rond de wortels waar OSL® aan is gedoseerd lag tussen de controle en de hoge doseringen stearinezuur, palmitinezuur of benzoëzuur, waarbij een hoge of lage doseerconcentratie van OSL® geen verschil maakte in bacteriële diversiteit.



Figuur 39. De diversiteit van de bacteriegemeenschap rond de wortelen van tomatenplanten waaraan drie verschillende exudaten of OSL® zijn gedoseerd. Exudaat 1 is stearinezuur, exudaat 2 is palmitinezuur, exudaat 3 is benzoëzuur, high is hoge concentratie gedoseerd, low is lage concentratie gedoseerd.

De samenstelling van de bacteriegemeenschap is op OTU niveau vergeleken tussen de verschillende monsters en deze verschillen zijn weergegeven in een PCoA-achtige plot (Figuur 40). De samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de tomatenplantwortels waaraan OSL® was gedoseerd, clusterde bij elkaar en week het sterkst af van de andere monsters (controle en monsters waaraan stearinezuur, palmitinezuur of benzoëzuur was gedoseerd). Over het algemeen werd ook waargenomen dat de bacteriegemeenschap rondom wortels waaraan een hoge concentratie van een exudaat werd gedoseerd bij elkaar clusterde, ongeacht het specifieke exudaat dat werd toegevoegd. Deze bacteriesamenstellingen waren ook duidelijk verschillend van die van de controle. De bacteriesamenstelling van de monsters rond wortels waaraan een lage concentratie van een exudaat werd gedoseerd clusterde over het algemeen ook bij elkaar en verschilde daarbij niet veel van de bacteriegemeenschap in de monsters van de controleplanten. Uit de resultaten van de statistische PERMANOVA bleek dat de toevoeging van een exudaat of OSL® inderdaad een significant effect had op de samenstelling van de bacteriegemeenschap ($p < 0,05$). Tevens werd waargenomen dat dit effect groter was wanneer een hoge concentratie werd gedoseerd ($p < 0,05$). Wanneer per exudaat- of OSL®-toevoeging werd getoetst bleek dat de hoge en lage dosering bij iedere toevoeging resulteerde in een significante andere bacteriesamenstelling dan de bacteriesamenstelling rond de wortels van de controleplanten ($p < 0,05$). Daarnaast was de bacteriesamenstelling bij een lage dosering ook weer anders dan bij een hoge dosering ($p < 0,05$). Bij de exudaatdoseringen van stearinezuur, palmitinezuur of benzoëzuur werd verder waargenomen dat het effect op de samenstelling het grootst was wanneer de hoge dosering werd toegevoegd, terwijl bij de OSL®-dosering een lage concentratie ook al een sterk effect had, maar dus wel resulteerde in een andere bacteriesamenstelling dan de hoge dosering.

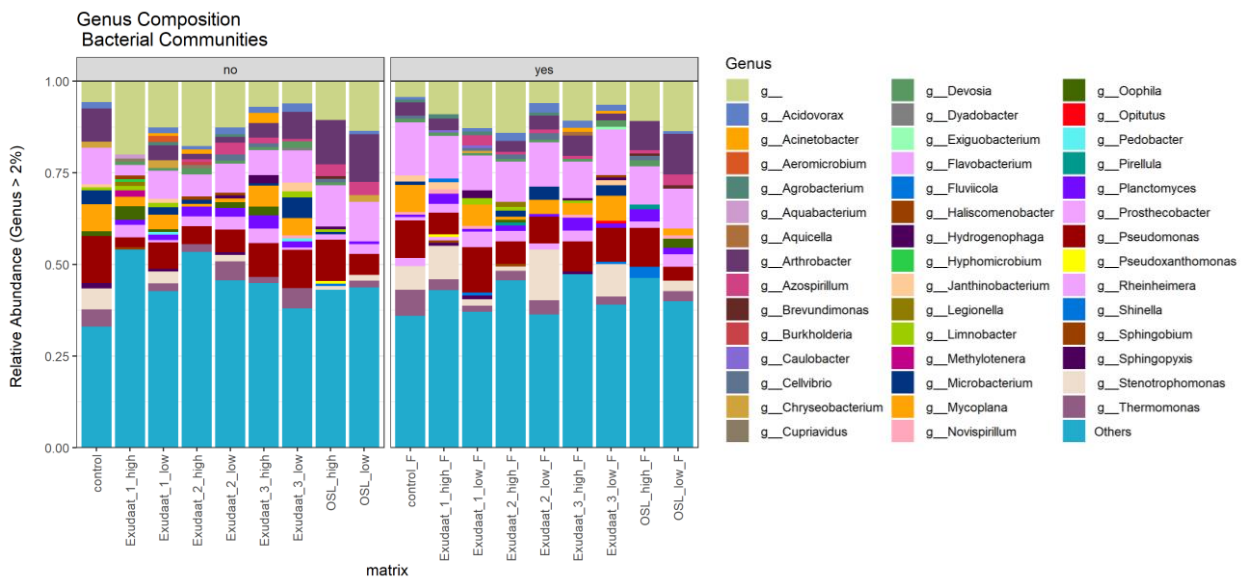


Figuur 40. Vergelijking, middels een PcoA-achtige plot, van de bacteriesamenstelling van alle monsters waar verschillende exudaten (exudaat 1, 2 en 3) of OSL® aan zijn toegevoegd met (y) of zonder (n) FORL. Exudaat 1 is stearinezuur, exudaat 2 is palmitinezuur, exudaat 3 is benzoëzuur, high is hoge concentratie gedoseerd, low is lage concentratie gedoseerd.

Wanneer alle monsters gezamenlijk werden geanalyseerd, dan bleek het toevoegen van FORL aan de planten de bacteriegemeenschap ook significant te veranderen ($p < 0.05$). Een diepere analyse per exudaat behandeling liet zien dat deze significante verschillen werden veroorzaakt door de controleplanten en de planten waaraan stearinezuur was toegevoegd. Bij de planten waar naast FORL ook palmitinezuur, benzoëzuur of OSL® werd toegevoegd, was de bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplant niet anders dan bij die planten waar geen FORL aan was toegevoegd.

In het eerdere experiment, waar neutrale en zuurfracties van laagmoleculair organisch stof, met-, en zonder FORL, werden toegevoegd aan tomatenplanten, werd waargenomen dat het toevoegen van FORL zorgde voor een relatieve toename in bacteriën die behoren tot het genus *Thermomonas*, terwijl bacteriën die behoorden tot het genus *Pseudomonas* en *Acinetobacter* afnamen (Figuur 36). Bij de controleplanten van het experiment met exudaat- of OSL®-doseringen, werd ook waargenomen dat bacteriën behoren tot het genus *Thermomonas* hoger en bacteriën behoren tot het genus *Pseudomonas* lager waren wanneer FORL werd gedoseerd (Figuur 41). De effecten waren echter minder groot dan in het eerste experiment. Daarnaast waren bacteriën die behoren tot het genus *Acinetobacter* deze keer nauwelijks aanwezig in de verschillende monsters. Bij de planten waar naast FORL ook nog een exudaat of OSL® werd gedoseerd, werd deze toename in *Thermomonas*- en afname in *Pseudomonas*-bacteriën niet of nauwelijks waargenomen vergeleken met de planten die hetzelfde exudaat of OSL® kregen gedoseerd maar dan zonder FORL. Tussen de doseringen zijn ook (kleine) verschillen waar te nemen in de

relatieve hoeveelheid van de dominante genera in de bacteriesamenstelling, maar consequente trends konden hierin niet worden waargenomen.



Figuur 41. De bacteriesamenstelling op genusniveau tussen monsters rond tomatenplantwortels waar FORL niet aan is toegevoegd (links) en waar FORL wel aan is toegevoegd (rechts). Hierbij worden alleen de meest dominante genera weergegeven, de recessieve genera zijn samengebracht in de kleurbalk "others". Exudaat 1 is stearinezuur, exudaat 2 is palmitinezuur, exudaat 3 is benzoëzuur, high is hoge concentratie gedoseerd, low is lage concentratie gedoseerd.

Uit de resultaten van het experiment met de dosering van verschillende exudaten of OSL® wordt geconcludeerd dat het toevoegen van één van de drie geteste exudaten stearinezuur, palmitinezuur of benzoëzuur óf OSL® tot een significante andere bacteriesamenstelling rond de wortels leidt dan wanneer deze toevoegingen niet worden gedaan. Daarnaast wordt geconcludeerd dat de gedoseerde FORL minder goed in staat is om de bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplanten te veranderen, indien palmitinezuur, benzoëzuur of OSL® worden toegevoegd. Het toevoegen van deze stoffen leidt dus tot de ontwikkeling van een robuustere microbiologie rond de wortels die lastiger te verstoren is door FORL dan wanneer die stoffen worden toegevoegd.

5.4.5 Vergelijking van NGS-resultaten bacteriepopulatie met andere resultaten

Bij de doseerproeven is, naast het effect op de samenstelling van de bacteriële gemeenschap, ook onderzocht wat het effect van deze doseringen is op de tomatenplant, ziekteverschijnselen van de plant in relatie tot FORL en op een aantal standaardparameters. De resultaten van die analyses zijn elders beschreven (zie H4.4), maar hier wordt kort bediscussieerd of de effecten die zijn waargenomen op de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels ook invloed heeft gehad op die andere parameters. Uit de NGS-resultaten is duidelijk geworden dat het doseren van middel- of hoogmoleculaire organische stoffracties (> 2 kDa of > 20 kDa) of het doseren van afzonderlijke exudaten of het OSL®-product de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels beïnvloedt en dat deze samenstelling niet wordt beïnvloedt wanneer ook FORL wordt gedoseerd. De dosering van deze stoffen aan de tomatenplanten laten echter geen duidelijk effect zien op de andere parameters. Zo zijn geen significante verschillen gevonden in het stengel- en bladgewicht tussen de planten die een dosering met organisch stof hebben gehad en de controleplanten. Daarnaast werd waargenomen dat bij de tomatenplanten waar deze organische stoffen aan zijn gedoseerd alle planten geïnfecteerd raakten met FORL en de heftigheid van de FORL symptomen op de wortelgroei was bij deze planten hetzelfde als bij de controleplanten. Bij enkele doseerproeven werd waargenomen dat het doseren van FORL aan de planten het stengel- en bladgewicht van de tomatenplanten verlaagden, maar bij andere doseerproeven werd dit effect niet waargenomen. De behandelingen met

organische stof hadden, zoals eerder gemeld, echter geen significante invloed op deze afname in stengel- en bladgewicht.

Uit deze resultaten wordt duidelijk dat hoewel de bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplanten robuuster is wanneer hoog- of laagmoleculaire organische stoffracties, bepaalde exudaten of het OSL®-product wordt gedoseerd, deze robuustere bacteriegemeenschap geen positieve invloed heeft op de opbrengst van de tomatenplanten of op de infectie (inclusief de heftigheid van de symptomen) met FORL. Diverse studies hebben laten zien dat de bacteriegemeenschap rond de wortels van planten de plant kan beschermen tegen plantpathogene ziekteverwekkers (Mendes et al. 2013 en referenties daarin). Een mogelijke verklaring waarom de robuustere bacteriegemeenschap rond de wortels van tomatenplanten geen invloed had op infectie van FORL en de symptomen die daarmee geassocieerd zijn, is dat de wortels van de planten zijn beschadigd voordat FORL werd gedoseerd. Door deze ingebrachte wortelbeschadiging waren de planten extra gevoelig voor infectie met FORL. Het is mogelijk dat wanneer was gekozen voor dosering van FORL zonder de wortels te beschadigen, de robuustere bacteriegemeenschap rond de wortels, die ontstond na dosering van bepaalde organische stoffen, beter in staat was om te voorkómen dat de tomatenplanten geïnfecteerd raakten met FORL.

Op basis van de vergelijking van deze resultaten wordt geconcludeerd dat hoewel het doseren van sommige organische stoffen resulteerde in een robuustere bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplanten, deze robuustere bacteriegemeenschap geen positief (of negatief) effect had op de opbrengst van de tomatenplanten of op bescherming van de tomatenplanten tegen een infectie met FORL.

5.5 Conclusies en aanbevelingen

5.5.1 Conclusies

Fusarium oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) heeft een significant effect op de bacteriesamenstelling rond de wortels van tomatenplanten die op substraat zijn gekweekt in proefkassen. Deze schimmel zorgt daarbij voor een toename van bacteriën die behoren tot het genus *Thermomonas* en een afname van bacteriën die behoren tot het genus *Pseudomonas* in de totale populatie.

Dosering van de neutrale fractie van laagmoleculair organisch stof (< 2 kDa) uit de drip of drain van een praktijklocatie waar tomaten worden gekweekt, hebben een significante invloed op de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van tomatenplanten gekweekt op substraat in een proefkas. Dit effect is echter minder sterk dan het effect dat FORL uitoefent op de bacteriesamenstelling. Dosering van deze neutrale fractie voorkómt niet dat FORL de bacteriesamenstelling verandert, zoals beschreven in de eerste conclusie. De dosering van de zuurfractie van laagmoleculair organisch stof uit de drip of drain van dezelfde praktijklocatie heeft geen significant effect op de bacteriesamenstelling rond de wortels van de tomatenplanten gekweekt op substraat in een proefkas.

De exudaten stearinezuur, palmitinezuur, benzoëzuur, het OSL®-product en de hoogmoleculaire (> 20 kDa) of laagmoleculaire (> 2 kDa) organische stoffracties die aan tomatenplanten zijn gedoseerd, hebben een significante invloed op de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van deze tomatenplanten die op substraat in een proefkas zijn geteeld. Het effect van palmitinezuur, benzoëzuur, het OSL®-product en de hoog- of laagmoleculaire organische stoffracties op de bacteriesamenstelling rond de wortels is dusdanig sterk dat aanwezige FORL daardoor niet langer in staat is om de bacteriesamenstelling rond de wortels significant te beïnvloeden.

Overall wordt geconcludeerd dat de dosering van bepaalde organische stoffen aan de tomatenplanten de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplanten gekweekt op substraat in een proefkas dusdanig robuust maakt, dat deze bacteriesamenstelling niet langer wordt beïnvloed door de plantpathogene FORL schimmel.

Deze robuustere bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplanten heeft echter geen positief (of negatief) effect op de opbrengst van de tomatenplanten of op bescherming van de tomatenplanten tegen een infectie met FORL.

5.5.2 Aanbevelingen

Uit de resultaten volgde dat het doseren van sommige organische stoffen een grotere invloed hadden op de bacteriesamenstelling rond de wortels dan andere stoffen. Zo werd de bacteriesamenstelling rond de wortels sterker beïnvloed door OSL® dan door een exudaat als stearinezuur, palmitinezuur of benzoëzuur. Het is daarom aan te bevelen om te achterhalen welke (mix van) organische stof(fen) resulteert in de hoogste robuustheid van de bacteriepopulatie rond de wortels. Dit kan worden gedaan door de proeven uit te breiden waarbij een hele range van verschillende organische stoffen (afzonderlijk en in een mix) worden getest op dezelfde manier als beschreven in dit rapport. Dat is echter een tijdsintensieve methode die veel kosten met zich mee brengt. Het is daarom raadzaam om te achterhalen of eenvoudigere groeiproeven met de autochtone microflora op het laboratorium ook geschikt zijn om de effecten op de bacteriesamenstelling rond wortels te voorspellen, inclusief de robuustheid daarvan op de plant pathogene micro-organismen.

Het ontbreken van een duidelijk effect van de organische stofdoseringen op de weerbaarheid van de tomatenplanten tegen een infectie met FORL zou veroorzaakt kunnen zijn door de proefopzet waarin wortels bewust werden beschadigd om ze gevoeliger te maken voor een FORL-infectie. Het is daarom raadzaam om in toekomstige proeven ook een extra groep planten mee te nemen waaraan ook FORL worden gedoseerd maar waarvan de wortels niet bewust worden beschadigd. Het meenemen van een dergelijke extra groep maakt het mogelijk om te achterhalen of een robuustere bacteriegemeenschap rond de wortels van tomatenplanten een beschermend effect heeft tegen FORL-infectie wanneer plantenwortels niet zijn beschadigd.

De experimenten beschreven in deze rapportage laten zien dat het doseren van bepaalde organische stoffen de bacteriesamenstelling rond de wortels van tomatenplanten beïnvloedt en de bacteriepopulatie weerbaar maakt tegen de plant pathogene schimmel FORL. Het is aan te bevelen om te achterhalen of deze stoffen ook de bacteriesamenstelling rond wortels van andere gewassen beïnvloedt en meer robuust maakt tegen FORL en om te achterhalen of de robuustheid ook toeneemt tegen andere plant pathogene micro-organismen dan FORL.

6 Algemene conclusie

Door de zuiveringsplicht is er in de sector veel aandacht voor emissie van waterstromen. Daarnaast kan gezuiverd water gerecirculeerd worden om verlies van (organische) nutriënten en water te voorkomen. Er werd onderzocht hoe de selectieve zuivering van water bij kan dragen aan de teelt en voor de groei en productie van de gewassen en ten slotte voor een weerbaar systeem voor de sier-, en vruchtgroententeelt onder glas. Er wordt hierbij gekeken naar aanwezigheid en sturing op “goede” Micro Flora in water en wortelmilieu (rhizosfeer).

Organische stof speelt een belangrijke rol als motor voor de ondergrondse biodiversiteit en de microbiologische gemeenschap. Over de identiteit van organische stof is weinig bekend. Dit omdat het een zeer diverse groep aan moleculen betreft en omdat er geen goede methoden zijn om deze zeer diverse groep aan moleculen te benoemen op identiteit en functie.

Ook in de waterstromen op het teeltbedrijf is er organische stof aanwezig. Het effect daarvan op de gewassen, de groei en de productie en eventueel het effect op ziekten en plagen is niet bekend.

Van oudsher wordt het organische stof en de microbiologische gemeenschap in de teelten los van de grond gezien als onwenselijk. Maar met het recirculeren van waterstromen is er meer aandacht hiervoor. Naast de negatieve aspecten hiervan, zoals biofilm vorming, groei van ziekten en plagen en autotoxiciteit, is er een toenemende aandacht voor positieve aspecten. Een voorbeeld hiervan is de groei van positief microleven dat een bijdrage levert aan groei en productie en de bescherming van de planten tegen ziekten en plagen in een weerbaar teeltsysteem.

Microleven reageert op organische stof. Planten bepalen de identiteit en aanwezigheid van microleven met het uitscheiden of lekken van organische wortellexudaten. Dit onderzoek beoogde daarom het in kaart brengen van microleven op praktijkbedrijven in de mat en met name rondom de wortels (rhizosfeer gemeenschap) onder invloed van organische stoffen. Om dit te bestuderen werden er twee sporen gevolgd, namelijk de invloed van anoniem organische stof en specifieke moleculen die in de teelt geïdentificeerd werden als wortellexudaten van een betreffend gewas. Ook zijn stoffen meegenomen in dit onderzoek waarvan bekend is dat ze een wortellexudaat kunnen zijn, ook al is het van een gewas dat zelfs niet in Nederland gekweekt wordt (onder glas). Hiervoor is gekozen om het onderzoek te versnellen en niet eerst te hoeven wachten op resultaten van de praktijk analyses van waterstromen op teeltbedrijven snij-gerbera, tomaat en phalaenopsis.

6.1 Praktijkmetingen

Bij het onderdeel inventarisatie microbiologie (H3) op de praktijkbedrijven is in eerste instantie de waterstroom binnen het bedrijf (met desinfectie/waterbehandeling) in kaart gebracht. Het laat zien dat het voedingswater in gewasteelt meestal relatief arm is in micro-organismen/microbiologische activiteit, dat deze toeneemt na passage door het plant/substraatsysteem en weer afneemt na waterbehandeling. Het effect van de gebruikte technologie (Opticlear Diamond) op het gehalte aan afbreekbare organische stof (BP7/BPC14) is complex: door de desinfectiestap (waterstofperoxide) kan dit afnemen, maar omdat ook bepaalde organische stoffen doorgelaten worden, kan het organische-stofgehalte ook gelijk blijven.

Bij de analyse (H4) van de fenolische zuren zijn er significante verschillen gevonden voor zowel locatie als bedrijfstype: De fenolische zuren worden vooral aangetroffen op het bedrijf met phalaenopsis in de drain en na de Opticlear Diamond (WaterIQ) waterbehandeling. Glucose wordt vooral aangetroffen in de teelt van gerbera. Fructose wordt vooral aangetroffen op het bedrijf met phalaenopsis en tomaat in met name in de maand april. Alleen fenolische zuren zijn significant verschillend tussen locaties als gecorrigeerd wordt voor het bedrijfstype (phalaenopsis, snij-gerbera en tomaat) en de tijdstippen (april, mei, augustus). Dit betekent dat er een significante hoeveelheid uit de drain komt. Dit wordt overigens maar gedeeltelijk gerecirculeerd.

6.2 Organische stof typeren

Uit de analyses van de verschillende fracties, verkregen door fractionering van aanvoer en drainwatermonsters, kan geconcludeerd worden dat de verschillen tussen aanvoer en drainwater vooral bepaald wordt door fenolische zuren en stoffen met een hogere moleculaire massa. Deze laatste zijn bepaald als de fractie met MW > 2 kDa (en 20 kDa). De vastgestelde toename hiervan in drainwater is onvoldoende om de toename hierin van de hoeveelheid organische stof te verklaren, zelfs als gecorrigeerd wordt voor de toename in verbindingen met een laag MW, zoals gevonden in de aan de XAD4-hars gebonden componenten.

Het gehalte organische stof (o.s.) is hoger in drainwater dan in aanvoerwater. Dit is volgens verwachting: het drainwater bevat wortellexudaten en die dragen bij aan het o.s.-gehalte van het water. Het suikergehalte van de waters is in het algemeen erg laag. Doordat dicht tegen de aantoonbaarheidsgrens wordt gemeten is het moeilijk een goed beeld te krijgen van de suikerconcentraties. Het probleem van aantoonbaarheid geldt ook voor de niet-fenolische organische zuren. Fenolische verbindingen zijn sterk verhoogd in de drainfracties. Identificatie ervan is echter moeilijk; alleen benzoëzuur kon worden aangetoond, maar slechts in hoeveelheden die niet de volledige toename van fenolische stof konden verklaren. De vetzuursamenstelling van de verschillende fracties heeft geen duidelijke correlaties aan het licht gebracht

6.3 Praktijk proeven opkweek

Doel van het onderzoek op de opkweek locatie met tomaat was om vast te stellen of de teelt positief beïnvloed kan worden door het toevoegen van wortellexudaten. Enerzijds wordt naar de groei gekeken onder invloed van de wortellexudaten, en anderzijds naar de samenstelling van micro-organismen (uitplaatmethode).

De gebruikte exudaten zijn gekozen op basis van de literatuur. Hierbij is enerzijds gekeken naar de meest bekende geïdentificeerde exudaten bij tomaat, en anderzijds welke exudaten bekend stonden om hun gunstige werking, bijv. de aantrekking van PGPR.

Proef 1

In de eerste praktijkproef zijn 5 wortellexudaten behandelingen toegepast. Er werden geen significante verschillen gevonden. Appelzuur en OSL-behandelde planten lijken net iets groter gem. bladoppervlak en stengelgewicht te hebben. Appelzuur lijkt hiernaast ook een hoger bladgewicht te hebben.

De SLA lijkt hoger in de planten behandeld met Cysteine en OSL dan controle en overige behandelingen. Overige metingen, zoals chlorofyl, stengel vers gewicht, SLA en bladgewicht, vertoonden ook geen significante resultaten.

Reden van trendobservatie in combinatie met laag aantal herhalingen per behandelingen (n=6) is de aanleiding geweest voor proef 2.

De behandeling die appelzuur heeft gekregen, heeft significant minder Na in het blad dan de controle, coumarine en OSL-behandelingen. De appelzuurbehandeling verschilt niet significant van de vanillinezuur- en cysteine behandeling.

De cysteine behandelde planten bevatten daarentegen minder Mg dan de controle en coumarine behandeling, maar verschilt niet significant van de rest.

Voor de overige nutriënten is geen significant verschil gevonden tussen de behandelingen.

Proef 2

Ondanks het hogere aantal herhalingen per behandeling (n=12) zijn de groeiparameters van proef 2 ook niet statistisch significant. Gemeten groeiparameters zoals chlorofyl, stengel versgewicht, bladgewicht vers en droog, hadden ook geen significante resultaten. De spreiding tussen planten onderling was vrij hoog.

Geen van de behandelingen laat significante verschillen zien in de nutriënteninhoud van het blad. Ook appelzuur niet, dat in de vorige proef significant minder natrium in het gewas had dan de controle.

6.4 Bio-assays

Uit de bioassays is gebleken, dat er in groei weinig effect te zien is na toevoeging van fractie- of exudaatbehandeling. Alleen bij "AF28 drain" zijn bladgewicht en stengelgewicht significant verhoogd, en onder invloed van een hoge dosering OSL zijn blad- en stengelgewicht significant verlaagd (2,5x hoger dan aanbevolen dosis). Hiernaast is het chlorofylgehalte lager na behandeling met hoge dosis benzoëzuur. Het gaat hier om een hogere dosis dan die binnen dit project in de praktijk is aangetroffen.

Dat organische stof bij normale doseringen geen negatieve effecten hebben op de groei, is goed nieuws voor telers die in de praktijk bang zijn voor de effecten van exudaten in recirculatiewater. Wel moet bedacht worden, dat de bio-assays alleen gedurende de opkweekperiode zijn uitgevoerd. Over effecten later in de teelt kan dus niets gezegd worden. Bovendien is tomaat een vrij robuust gewas, het is hierom raadzaam om in toekomstige proeven naast tomaat ook gevoeliger gewassen mee te nemen.

Bij de toevoeging van FORL is in sommige gevallen een significant verlaagd stengel- en bladgewicht waargenomen, in andere proeven is dit niet het geval. Deze afname is niet significant beïnvloed door de behandelingen met exudaten of fracties.

Geen van de toegevoegde exudaten of fracties voorkomt besmetting met FORL. Er was in de wortels geen verschil te zien in de heftigheid van de symptomen tussen verschillende behandelingen, er was ook geen verschil in de mate waarin FORL op plaat groeide tussen verschillende behandelingen. Geen van de behandelingen maakt de plant weerbaarder tegen FORL. Bij OSL en 20 en 2K-fractie behandelde planten verandert de samenstelling van de microbiële gemeenschap niet significant onder invloed van FORL, bij de overige behandelingen wel. Ondanks de robuustere microbiële gemeenschap bij deze behandelingen, is er in groei of symptomen in wortels geen grotere weerbaarheid tegen FORL gevonden onder invloed van deze behandelingen. Dit kan te maken hebben met de manier van inoculatie, waarbij de wortels beschadigd zijn. Eventuele beschermende werking van de microbiële gemeenschap in het wortelmilieu zou hierdoor omzeild kunnen zijn geweest. Zodoende is het raadzaam om in vergelijkbare proeven ook planten mee te nemen, waar FORL in het wortelmilieu wordt geïntroduceerd zonder wortelbeschadiging.

6.5 Metagenomica rhizosfeer gemeenschap

Fusarium oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) heeft een significant effect op de bacteriesamenstelling rond de wortels van tomatenplanten die op substraat zijn gekweekt in proefkassen. Deze schimmel zorgt daarbij voor een toename van bacteriën die behoren tot het genus *Thermomonas* en een afname van bacteriën die behoren tot het genus *Pseudomonas* in de totale populatie.

Dosering van de neutrale fractie van laagmoleculair organisch stof (< 2 kDa) uit de drip of drain van een praktijklocatie waar tomaten worden gekweekt, hebben een significante invloed op de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van tomatenplanten gekweekt op substraat in een proefkas. Dit effect is echter minder sterk dan het effect dat FORL uitoefent op de bacteriesamenstelling. Dosering van deze neutrale fractie voorkómt niet dat FORL de bacteriesamenstelling verandert, zoals beschreven in de eerste conclusie. De dosering van de zuurfractie van laagmoleculair organisch stof uit de drip of drain van dezelfde praktijklocatie heeft geen significant effect op de bacteriesamenstelling rond de wortels van de tomatenplanten gekweekt op substraat in een proefkas.

De exudaten stearinezuur, palmitinezuur, benzoëzuur, het OSL en de hoogmoleculaire (> 20 kDa) of laagmoleculaire (> 2 kDa) organische stoffracties die aan tomatenplanten zijn gedoseerd, hebben een significante invloed op de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van deze tomatenplanten die op substraat in een proefkas zijn geteeld. Het effect van palmitinezuur, benzoëzuur, het OSL-product en de hoog- of laagmoleculaire organische stoffracties op de bacteriesamenstelling rond de wortels is dusdanig sterk dat aanwezige FORL daardoor niet langer in staat is om de bacteriesamenstelling rond de wortels significant te beïnvloeden.

Overall wordt geconcludeerd dat de dosering van bepaalde organische stoffen aan de tomatenplanten de samenstelling van de bacteriegemeenschap rond de wortels van de

tomatenplanten gekweekt op substraat in een proefkas dusdanig robuust maakt, dat deze bacteriesamenstelling niet langer wordt beïnvloedt door de plantpathogene FORL schimmel. Deze robuustere bacteriegemeenschap rond de wortels van de tomatenplanten heeft echter geen positief (of negatief) effect op de opbrengst van de tomatenplanten of op bescherming van de tomatenplanten tegen een infectie met FORL.

7 Aanbevelingen

Het onderzoek heeft een eerste indruk gegeven bij de identiteit van organische stof fracties op teeltbedrijven onder glas. Fenolen lijken een belangrijke rol te spelen voor het gewas, maar de meeste fenolen in de waterstroom zijn onbekend.

Het microleven rondom de wortels kan beïnvloed worden door organische stoffen waarbij de concentratie meer effect lijkt te hebben dan de identiteit van de organische stof. Ook de aanwezigheid van *Fusarium* heeft een duidelijk effect op de soortensamenstelling rondom de wortels. Bij voldoende organische stof toevoeging lijkt er echter een buffering op te treden tegen dit effect. Het effect op de plant is vooralsnog onduidelijk. In dit onderzoek is tomaat gebruikt als modelplant. Bij tomaat zijn er weinig effecten gezien, op groei en plantweerbaarheid tegen *Fusarium*, door de diverse organische stof toevoegingen. Mogelijk zijn er wel effecten te zien in de teelt, of proeven met een langere tijdsduur en mogelijk op andere gewassen dan tomaat. Bediscussieerd wordt dat ook de manier waarop de planten werden behandeld met *Fusarium*, namelijk het beschadigen van de wortels, een reden kan zijn waarom er geen effecten werden gezien van organische toevoegingen op de weerbaarheid van de wortel en de plant tegen *Fusarium*.

De kwaliteit van het recirculatiewater is belangrijk voor de teeltzekerheid. Belangrijke aspecten voor de waterkwaliteit zijn het organische stof, zoals uit wortels en substraat, en de bijbehorende microbiologie. De microbiologie kan slechte effecten hebben op het gewas. Voorbeelden van slechte microbiologie zijn de ziekten zoals *Fusarium*, *Pythium* en *Phytophthora*. Of de microbiologie een goede werking kan hebben is nog weinig over bekend. In onderzoek is aangetoond dat er complexe gemeenschappen kunnen zijn en dat de aanwezigheid van ziekten zoals *Fusarium*, een effect heeft op de microbiële soortensamenstelling. Ook is bekend dat bij toevoegen van organische stoffen uit de drain, de microbiologische samenstelling minder verandert qua samenstelling, zelfs in de aanwezigheid van *Fusarium*. Het effect van die constante soortensamenstelling op plantgroei, en -weerbaarheid is echter onbekend. Wel is duidelijk dat er gestuurd kan worden op de samenstelling met organische stoffen.

In systemen in de grond, zoals biologische teelt van vruchtgroenten of sierteelt zoals chrysant, is het duidelijk aangetoond dat het microleven een belangrijke rol speelt in de opname van nutriënten en het weerbaar maken van planten.

In de tuinbouw wordt eenzijdig gekeken naar de microbiologie. Een maat zoals het kiemgetal (fractie uitplaatbare bacteriën) wordt routinematig ingezet om de effectiviteit van de ontsmetter te controleren. Het kiemgetal wordt routinematig gebruikt als schatter voor het risico op ziekten zoals *Fusarium* en effectiviteit van de ontsmetting zoals door ozon of geavanceerde oxidatie.

Om sneller en beter een beeld te krijgen van de microbiologie in het water op het bedrijf is een real-time meting noodzakelijk. Eerder is onderzoek uitgevoerd naar het eenvoudig-, maar snel en automatisch, meetbaar maken van het kiemgetal in water. Daarbij werd onderzocht of zuurstofmetingen in gesloten kamers of een redox (ORP) metingen hiervoor gebruikt konden worden. Beide methoden moeten verbeterd worden om een betrouwbaar beeld te geven van de hoeveelheid bacteriën in het (recirculatie)water.

Binnen nieuw onderzoek zou hierop aangesloten kunnen worden en een automatische bepaling van het kiemgetal te realiseren. Ook wordt verder onderzocht welke groepen aan microleven goed slecht kan zijn voor de teelt. Dit wordt eerst gedaan op basis van de literatuur. Er wordt een grove indeling gemaakt op basis van bekende functies, zoals rol in plantweerbaarheid, plantgroei verbetering etc. In lab-proeven worden deze relaties onderzocht aan de hand van enkele modelgewassen.

Vervolgens worden, indien er gereede aanleiding toe is, praktijkmetingen gemaakt voor specifieke functionele groepen microbiologie, zoals aerobe-, en anaerobe fracties (bv. melkzuurbacteriën) om meer inzicht te krijgen in de dynamiek de waterkwaliteit door middel van functionele groepen microleven en te kunnen sturen met meet-, en regeltechnieken.

8 Dankwoord

Onze dank gaat uit naar Joost van Buul (Brabant Plant), Marvin Verkuijlen (Brabant Plant), Erwin van Vliet (Levo Plant) Rob Olsthoorn en Leon Kouwenhoven (OK Plant), Martin van der Mei (Flori Consult snij-gerbera), Eric Vereijken (Vereijken Kwekerijen BV), Luc Hornstra (KWR) en Margreet Schoenmakers (Glastuinbouw Nederland).

9 Referenties

- Activiteitenbesluit, <https://www.infomil.nl/onderwerpen/klimaat-lucht/handboek-water/wetgeving/regelgeving-0/activiteitenbesluit/>
- Beerling, E. 2011. Reducing pesticide emission from greenhouses: a joint agenda setting. Bulletin IOBC/WPRS Bulletin 68 (2011) - p.5-9
- Beerling, E.A.M., C. Blok, A.A. van der Maas en E.A. van Os (2014). Closing the Water and Nutrient Cycles in Soilless Cultivation Systems. Acta Hort. 1034: 49-56
- Beerling, E., Os E. van, Ruijven, J. van, Janse, J., Lee, A and Blok, C., 2016. Water-efficient zero-emission greenhouse crop production: a preliminary study. Proc. IS on New Technologies and Management for Greenhouses. Acta Hort. In press
- Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C. A.; Turnbaugh, P. J.; Fierer, N.; Knight, R., Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proceedings of the National Academy of Sciences 2011, 108 (Supplement 1), 4516.
- Chen, C., Belanger, R. R., Benhamou, N., & Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56(1), 13-23.
- De la Peña C, Lei Z, Watson BS, Sumner LW, Vivanco JM 2008. Root-microbe communication through protein secretion. J. Biol. Chem. 283: 25247–25255.
- Rocha ACR, Almeida CMR, Bastoa MCP, Vasconcelos MTSD 2014. SPE sample pre-treatment using a mixed-mode sorbent of reverse-phase and ionic exchange for determination of ALMWOAs in waters. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 94: 233-246.
- Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, Tranvik LJ. (2003) Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. . Appl. Environ. Microbiol., p. 3701–3709
- Han, S., & Micallef, S. A. (2016). Environmental metabolomics of the tomato plant surface provides insights on Salmonella enterica colonization. Appl. Environ. Microbiol., 82(10), 3131-3142.
- Hofland-Zijlstra et al., 2011, Kennisinventarisatie naar de achtergronden en toepassingen van electrochemisch geactiveerd water in de agrarische sector. Rapport GTB-1087
- Hornstra L.M. en Van der Wielen. Structurele aanpak microbiologische waterkwaliteitsproblemen bij teelt op water en substraat. KWR Rapport 2017.013
- Hyder, N. J.J. Sims, S.N. Wegulo (2009) In Vitro Suppression of Soilborne Plant Pathogens by Coir. HortTechnology p96-100.
- Huang, X.F, J.M. Chaparro, K.F. Reardon, R. Zhang, Q. Shen, J.M. Vivanco (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. Botany, 2014, 92(4): 267-275, <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225>
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. Molecular plant-microbe interactions, 19(10), 1121-1126.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19(3), 250-256.
- Kromwijk, A. 2016. Recirculatie potorchidee. Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk.
- Lee JG, Lee BY, Lee HJ 2006. Accumulation of phytotoxic organic acids in reused nutrient solution during hydroponic cultivation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). 2006. Scientia Horticulturae 110: 119–128.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol Rev. 37(5):634-63. doi: 10.1111/1574-6976.12028. Epub 2013 Jul 22. PMID: 23790204.

- M'piga, P., Belanger, R. R., Paulitz, T. C., & Benhamou, N. (1997). Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50(5), 301-320.
- Pachepsky Y1, Morrow J, Guber A, Shelton D, Rowland R, Davies G 2012. Effect of biofilm in irrigation pipes on microbial quality of irrigation water. *Lett Appl Microbiol*. Mar;54(3):217-24.
- Steinkellner, S., Mamerler, R., & Vierheilig, H. (2005). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. *Journal of plant interactions*, 1(1), 23-30.
- Teira. E., S. Martínez-García, A. Calvo-Díaz, X.A.G. Morán (2010) Effects of inorganic and organic nutrient inputs on bacterioplankton community composition along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean *Aquat Microb Ecol*. 60: 299 – 313.
- Van Bost P 2015. Karakterisering en analyse van wortellexudaten in irrigatiewater van sla- en aardbeienteelten op hydrocultuur. Master thesis, Universiteit Gent, België.
- Van der Wurff, A.W.G., C. Blok, J. Janse G. Messelink, J. Hofland-Zijlstra, S. Driever, M. van der Staaij, J. Postma, J. Wubben, J. Bij de Vaate, W. Holtman, B. Oppedijk (2011) Weerbaar Substraat: Opstellen Matrix - Bouwstenen voor weerbaar telen. Rapport GTB-1119.
- Van der Wurff, A.W.G., C. Blok, J. Janse G. Messelink, J. Hofland-Zijlstra, S. Driever, M. van der Staaij, J. Postma, J. Wubben, J. Bij de Vaate, W. Holtman, B. Oppedijk (2013) Weerbaar. Substraat: Praktijkproeven - Ontwikkeling toets methodiek en eerste toetsing op gewasschade van tien concepten bij tomaat, komkommer en gerbera. Rapport GTB-1285.
- Van Eck Bedrijfshygiëne. <http://www.vaneckbv.nl/nl/producten-en-diensten/leidingen-spoelen/>
- Van Os en Kromwijk, 2014. Reinigen van leidingen (chloordioxide). Factsheet nr 6 voor orchideeëntelers.
- Vranova V, Rejsek K, Skene KR, Janous D, Formanek P 2013. Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 176: 175–199.
- Wageningen Economic Research (LEI), 2016. <http://www.agrimatie.nl/SectorResultaat.aspx?subpubID=2232§orID=2240>

Bijlage 1. Consortium



LTO Glaskracht

<https://www.ltoglaskrachtnederland.nl/>

In LTO Glaskracht Nederland werken LTO Noord Glaskracht, ZLTO en LLTB samen aan landelijke activiteiten op het gebied van sectorale beleidsbeïnvloeding, innovatie en kennisuitwisseling ten behoeve van het ondernemersnetwerk. Samen vertegenwoordigt LTO 70% van het totale glastuinbouwareaal en geeft invulling aan de landelijke activiteiten op het gebied van Arbeid, Energie, Plantgezondheid en Water & Omgeving.

KWR Watercycle Research Institute

<https://www.kwrwater.nl/>

KWR Watercycle Research Institute is een wateronderzoeksinstituut waar vooral veel onderzoek wordt gedaan voor de Nederlandse drinkwaterbedrijven, welke ook aandeelhouders zijn. Bridging Science to Practice is het motto van KWR. Onze onderzoekers werken op het snijvlak van wetenschap, bedrijfsleven en samenleving. Hun kracht schuilt in de vertaling van wetenschappelijke kennis naar toepasbare praktijkoplossingen voor eindgebruikers. We hebben een stevige reputatie opgebouwd als innovatieversneller en internationale netwerkbouwer van topniveau. In (inter)nationale samenwerkingsverbanden vervullen we steeds vaker een coördinerende rol. KWR heeft vanuit dit onderzoek een lange staat van dienst voor wat betreft kennis over biologische activiteit/stabiliteit van water en het beheersen hiervan. KWR beschikt over een uitgebreid gecertificeerd microbiologisch laboratorium, en over een proefhal waar testopstellingen worden ontwikkeld en getest.

Stichting Control Food & Flowers

<http://www.stfoodandflowers.nl/>

De Stichting Control Food & Flowers (SCFF) heeft sinds 2014 veel ervaring opgebouwd in de tuinbouw sector met betrekking tot waterkwaliteit, weerbaar telen en ontwerp en uitvoer van diverse metingen en onderzoek naar effectiviteit van middelen. De Stichting is betrokken bij divers onderzoek voor de tuinbouw, o.a. het maken van een Weerbaar Water systeem (WTU17002 - Microbieel gezond water in de glastuinbouw) waarbij er gestuurd wordt op microleven in waterstroom en wortelmilieu voor een weerbare teelt tegen ziekten met diverse glastuinbouw bedrijven. SCFF heeft de beschikking over (microbiologisch) laboratoria, proefkassen en meetapparatuur (breed scala aan chromatografische apparatuur zoals HPLC met

Groen Agro Control

LABORATORIUM ONDERZOEK & ADVIES



diverse detectoren zoals DAD, MS). Hierdoor is het, samen met meetbedrijf GAC en Sendot sensoren de meest geschikte partner voor het uitvoeren en ontwikkelen van metingen en de doorvoer naar de praktijk.

Groen Agro Control

<http://www.agrocontrol.nl>

Groen Agro Control is een laboratorium en adviesbureau gericht op de AGF-keten en de levensmiddelensector. GAC biedt voor het controleren van de kwaliteit van ontsmettingsapparatuur een standaard pakket aan metingen aan, w.o. kiemgetal en residuen. De werkzaamheden richten zich met name op fysische, chemische en microbiologische aspecten in de productie, handel en verwerking van groente en fruit en levensmiddelen. De ontwikkelingen in het laboratorium zijn erop gericht om zo goed mogelijk aan de wensen van onze klanten te voldoen. Het lab is ISO 17025 geaccrediteerd. GAC ondersteunt de sector door het aanbieden van meetpakketten voor het bepalen van de waterkwaliteit en voor het bepalen van de hygiëne en de effectiviteit van ontsmetters.

.

Bijlage 2. Overzicht van micro-organismen betrokken bij weerbaarheid

Genus	Relative abundance (%) (Mean \pm SE)		P-value	Potential environmental role**	References [§]
	Control	Biochar-3%			
<i>Burkholderia</i>	9.19 \pm 0.394 a*	5.97 \pm 0.180 b	0.0003	PP, BCA, PGP, N ₂ fixation	83–85
<i>Massilia</i>	3.03 \pm 0.480 b	4.51 \pm 0.167 a	0.0272	BCA, PGP	86
<i>Mucilaginibacter</i>	6.80 \pm 0.361 a	0.61 \pm 0.042 b	<0.0001	PGP	87
<i>Rhodanobacter</i>	2.25 \pm 0.085 b	4.03 \pm 0.206 a	0.0002	BCA, Denitrification process, Aromatic compound degrader	88–90
<i>Sphingobium</i>	1.98 \pm 0.074 b	2.38 \pm 0.015 a	0.0370	BCA	91
<i>Bradyrhizobium</i>	2.53 \pm 0.056 a	1.64 \pm 0.075 b	<0.0001	N ₂ fixation, BCA, PGP	92
<i>Devosia</i>	0.76 \pm 0.023 b	3.37 \pm 0.115 a	<0.0001	N ₂ fixation	93
<i>Sphingomonas</i>	3.06 \pm 0.103 a	0.98 \pm 0.079 b	<0.0001	BCA, Aromatic compound degrader, PP	94–96
<i>Flavobacterium</i>	0.01 \pm 0.004 b	2.34 \pm 0.153 a	<0.0001	BCA, PGP (chitinolytic bacteria)	27
<i>Pseudomonas</i>	0.17 \pm 0.131 b	1.46 \pm 0.276 a	0.0055	BCA, PGP (chitinolytic and cellulolytic bacteria), PP	45,46,97
<i>Chthoniobacter</i>	0.22 \pm 0.015 b	0.65 \pm 0.080 a	0.0020	OCD	98
<i>Achromobacter</i>	0.05 \pm 0.013 b	0.82 \pm 0.044 a	<0.0001	BCA, PGP	99,100
<i>Rhizobium</i>	0.28 \pm 0.037 b	0.51 \pm 0.031 a	0.0033	N ₂ fixation, BCA, PGP (chitinolytic bacteria)	101
<i>Mesorhizobium</i>	0.22 \pm 0.042 b	0.52 \pm 0.027 a	0.0009	N ₂ fixation, BCA, PGP	102
<i>Nitratreductor</i>	0.19 \pm 0.018 b	0.42 \pm 0.035 a	0.0012	PAH degrader (pyrene)	103
<i>Ochrobactrum</i>	0.05 \pm 0.044 b	0.40 \pm 0.040 a	0.0009	N ₂ fixation, BCA, Aromatic compound degrader, OCD	104,105
<i>Cellvibrio</i>	0.00 \pm 0.000 b	0.38 \pm 0.089 a	0.0055	N ₂ fixation, PGP (cellulolytic bacteria)	23
<i>Brevundimonas</i>	0.05 \pm 0.017 b	0.31 \pm 0.010 a	<0.0001	PGP	106
<i>Peredibacter</i>	0.00 \pm 0.000 b	0.36 \pm 0.045 a	0.0002	BCA	107
<i>Bacillus</i>	0.02 \pm 0.009 b	0.28 \pm 0.034 a	0.0003	BCA, PG (chitinolytic and cellulolytic bacteria), PP	108,109
<i>Ferritrophicum</i>	0.02 \pm 0.005 b	0.26 \pm 0.019 a	<0.0001	Fe(II)-Oxidizer	110
<i>Comamonas</i>	0.02 \pm 0.006 b	0.25 \pm 0.028 a	0.0002	BCA, Aromatic compound degrader	111,112
<i>Sphingopyxis</i>	0.00 \pm 0.002 b	0.21 \pm 0.034 a	0.0009	Oil and recalcitrant polyaromatic compounds degrader, OCD	113
<i>Stenotrophomonas</i>	0.01 \pm 0.006 b	0.20 \pm 0.006 a	0.0050	BCA, PGP (chitinolytic bacteria), Aromatic compound degrader	114–116
<i>Paenibacillus</i>	0.01 \pm 0.005 b	0.19 \pm 0.026 a	0.0004	BCA, PGP (cellulolytic and chitinolytic bacteria), PAH degrader	117,118
<i>Novosphingobium</i>	0.01 \pm 0.008 b	0.19 \pm 0.012 a	<0.0001	BCA, PGP, Aromatic compound degrader	119,120
<i>Afiptia</i>	0.02 \pm 0.006 b	0.17 \pm 0.010 a	<0.0001	OCD	121
<i>Shtnella</i>	0.01 \pm 0.008 b	0.16 \pm 0.012 a	<0.0001	N ₂ fixation, OCD	122,123
<i>Microvirga</i>	0.00 \pm 0.002 b	0.17 \pm 0.032 a	0.0017	N ₂ fixation	124
<i>Azospirillum</i>	0.00 \pm 0.000 b	0.11 \pm 0.012 a	0.0001	N ₂ fixation, BCA, PGP	125
<i>Cytophaga</i>	0.01 \pm 0.010 b	0.09 \pm 0.026 a	0.0318	OCD (chitinolytic bacteria)	126

Table 2. Relative abundance of bacteria genera related to plant growth promotion, disease suppression and other possible ecological roles that are significantly influenced by biochar amendments as identified by using the Illumina sequencing of 16S rRNA gene amplicons. *Values of each genus (row) labeled by a different small letter are significantly different at $P \leq 0.05$ according to Student's t-test. **Potential environmental role of bacteria genera: BCA (biocontrol agents); PGP (plant growth promotion); OCD (organic compound degradation); PP (plant pathogen) as previously described in literature. §References cited in this table (reference no. 83–126) is presented in Supplementary data reference.

From: Jaiswal et al. 2017

Bijlage 3. Overzicht parameters praktijkbemonsteringen.

teelt	DOC	fen.zuur	glucose	fructose	suikers	cyr	palm	stea	bacterien	pseudom	Melkzb.	Sch/gist	Gist	Schim	locatie	datum
3	24,85077	2 8,29852	0,074745	0,326205	0,40095	13,3	50,8	35,9	90000	1000	21	1440	2	1400	2	1
3	25,78853	17,12652	0,141278	0,674235	0,815513	8,9	52,8	38,2	30000	20	3	60	2	2	2	1
3	37,01413	2,516965	0,136455	0,155453	0,291908	0	0	0	7000	1000	17	180	2	70	3	1
1	58,88612	219,0821	0	0,528615	0,528615	0	0	0	19000	20	390	170	2	80	1	1
1	47,6881	150,3312	0	0,526965	0,526965	100	0	0	3000	20	11	460	440	20	2	1
1	20,98938	30,44699	0	0,82323	0,82323	15,3	47,3	37,3	2400	20	1	80	40	2	3	1
3	45,81257	40,32992	0,109185	0,172973	0,282158	8,6	49,3	42,1	44000	100	18	460	10	460	1	2
3	24,3543	17,55621	0	0	0	11,7	43,3	38,4	8000	200	29	50	10	40	2	2
3	26,03676	2,087273	0,181358	0,09705	0,278408	0	49,1	39	5000	10	13	80	10	10	3	2
1	68,16	220,8008	0	0,403133	0,403133	10,5	48,4	41,2	47000	2000	680	170	10	110	1	3
1	28,87	42,47838	0	0,481065	0,481065	16,1	42,2	34,1	19000	100	30	560	10	560	2	3
1	34,09	18,84529	0	0,121185	0,121185	24,3	41,8	33,9	28000	100	12	510	260	200	3	3
2	35,89	94,90088	0	0,14916	0,14916	9,3	24,7	66	30000	2000	40	300	10	270	1	3
2	32,31	45,48623	0	0,152993	0,152993	16,7	43,5	33,5	6000	1000	50	260	10	220	2	3
2	41,22	84,15857	0	0,212205	0,212205	10,6	46,2	40	2200	200	16	230	40	180	3	3

Teelt 1= tomaat, 2=snij-gerbera, 3=phalaenopsis, locatie 1=drain, 2=na Opticlear diamond, 3=verzamelbak/watergift. Datum 1= 8/4/19, 2=13/5/29, 3=12/10/19.



uw partner voor teeltzekerheid!

De Stichting Control in Food & Flowers voert onderzoek uit op het gebied van agrarische productie, voeding en hieraan gerelateerde biotechnologie. De Stichting heeft als doel het bevorderen van innovatieve technologische kennis op het gebied van productie en kwaliteit van levensmiddelen en agrarische producten in de sector. Dit vindt plaats door het uitvoeren van onderzoek en ontwikkeling, samenwerken met andere organisaties, bevorderen van technologische kennis, kennisoverdracht, voorlichting en wetenschappelijke publicaties.

Stichting Control in Food & Flowers
Distributieweg 1
2645 EG Delfgauw
T: +31(0) 15-2858124
E: info@stfoodandflowers.nl
www.stfoodandflowers.nl
KvK: 61916471