

Microbiologie in het veenweidegebied Koufurderrige

Rapportage

Opdrachtgever: Louis Bolk Instituut



creating with the power of nature

OPDRACHTGEVER: Louis Bolk Instituut
PROJECTTITEL: Microbiologie in het veenweidegebied
Koufurderrige
PROJECTCODE: 20235994/13685
DOCUMENTTYPE: Rapportage
PUBLICATIEDATUM: 26 november 2024
PROJECTLEIDER: Jidske Knigge
AUTEUR(S): Jidske Knigge
COLLEGIALE TOETS: Eline Keuning

Bioclear earth b.v.
Rozenburglaan 13C; 9727 DL Groningen
Telefoon: 050 571 84 55
Email: info@bioclearearth.nl
Website: www.bioclearearth.nl



Bioclear earth is gecertificeerd conform
ISO 9001:2015.



Bioclear earth beschikt over de
procescertificaten BRL SIKB 2000, BRL SIKB
6000 en de onderliggende protocollen 2002 en
6002.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden
vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk,
fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder
voorafgaande toestemming van Bioclear earth.

© Bioclear earth b.v.

Bioclear earth adviseert bedrijven, overheden en dienstverlenende
organisaties op het terrein van Bodem, Water en Klimaat.

Op opdrachten aan Bioclear earth zijn van toepassing de Algemene
Voorwaarden voor onderzoeksopdrachten aan Bioclear earth, zoals
gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Groningen.

Inhoudsopgave

1	Inleiding	1
2	Proefopzet	3
3	Bemonstering	4
4	Resultaten	5
4.1	Clustering	5
4.2	Biodiversiteit	6
4.3	De relatie tussen chemische en fysische parameters en de microbiologie	9
4.4	Soorten in relatie tot veenafbraak	10
4.5	Soorten in relatie tot bodemgezondheid in de toplaag	13
4.5.1	De stikstofkringloop	13
4.5.2	Plantgroei bevorderende soorten	16
5	Conclusie en discussie	18

Bijlage 1	Literatuur
Bijlage 2	MDS schimmels en archaea 0-25 cm
Bijlage 3	RDA analyse chemie
Bijlage 4	Achtergrondinformatie stikstofkringloop
Bijlage 5	Correlatie nitrificerende bacteriën en pH
Bijlage 6	Penicillium

1 Inleiding

In opdracht van het Louis Bolk Instituut (LBI) heeft Bioclear earth een verkennend onderzoek uitgevoerd naar de microbiologie bij een veehouder in het veenweidegebied in Koufurderrige. Bij deze veehouder ligt sinds 2021 een bemestingsproef van het LBI, waarbij gedurende meerdere jaren verschillende vormen van bemesting met een gelijke stikstofgift worden aangebracht.

Het verkennende onderzoek naar de microbiologie heeft twee doelstellingen:

1. Onderzoeken of er microbiologie met de potentie om veen af te kunnen breken voorkomt in drie verschillende bodemlagen en zo ja; of en hoe deze verschilt tussen verschillende bemestingsvormen.
2. Het onderzoeken van het effect van bemesting op microbiologie in relatie tot bodemgezondheid in de toplaag (klei).

Uit eerdere projecten van Bioclear is bekend dat bemesting invloed heeft op de microbiologie in de toplaag. Deze verschillen zaten onder andere in voor agrariërs relevante soorten, zoals bacteriën met plantgroei bevorderende eigenschappen, arbusculaire mycorrhiza schimmels en soorten die een rol spelen in de stikstofkringloop (*Stikstof, mest en bodemgezondheid*, 2023). Het is nog onbekend of bemesting ook invloed heeft op soorten die een relatie hebben met veenafbraak en of er een effect is van bemesting op de diepere lagen in het veen. Veenafbraak is ongewenst omdat dit leidt tot bodemdaling en het vrijkomen van het broeikasgas CO₂. Het onderzoeken van de rol van microbiologie in veenweide gebieden is een nieuwe invalshoek die door de vele keuzes in beheer die agrariërs maken (waaronder bemesting) mogelijk interessante handelingsperspectieven kan bieden om veenafbraak te monitoren.

In de wetenschappelijke literatuur is nog weinig bekend over de exacte rol van microbiologie in veenafbraak. Algemeen bekend is dat het droogleggen van veen zorgt voor zuurstof in de bodem, wat resulteert in meer microbiële activiteit en het afbreken van organisch materiaal. Hierbij zijn een aantal groepen bacteriën en schimmels met name interessant vanwege hun cellulolytische en lignolytische activiteit. Deze soorten behoren met name tot de bacteriële phyla *firmicutes*, *bacteroidetes*, *actinobacteria* en *proteobacteria* en de saprotrofe schimmels (Agbor *et al.*, 2014). In een recent onderzoek uit Australië zijn verschillen gevonden in microbiologie tussen gezond veen en veen waar veenafbraak plaats vindt; zo bleek onder andere dat de biodiversiteit van het intacte veen hoger was en dat er meer saprotrofe schimmels voorkwamen in het afgebroken veen (Birnbaum *et al.*, 2023). Een verlaging van de biodiversiteit bij drooggelegde venen blijkt ook uit een ander onderzoek, waarbij door heel Europa intacte, vernatte en drooggelegde laagvenen (fen peats) zijn onderzocht (Emsens *et al.*, 2020).

Daarnaast blijkt uit dit onderzoek ook dat in intact veen *Proteobacteria* in de diepere veenlagen minder voorkomen en dat herstel van de microbiële samenstelling door vernatting mogelijk is, mits de kwaliteit en het gehalte organische stof niet te veel is veranderd.

De veenbodem in Koufurderrige

De veenweidebodem in Koufurderrige bestaat uit schalterveen met daarop een kleilaag van circa 35 centimeter. Tussen het onafgebroken schalterveen in de diepere laag en de toplaag zit een laag veen waar de omstandigheden afwisselend aeroob en anaeroob zijn. Deze veenlaag is anders van kleur (zwarter) en bevat ook klei. Door het perceel heen zit variatie, waardoor op sommige plekken de kleilaag of de zwarte (aerobere) veenlaag dikker is dan op andere plekken. Hierdoor is het belangrijk om in het veld visueel te bepalen op welke diepte er wordt bemonsterd zodat de verschillende bodemlagen niet gemixt worden. Hier is rekening mee gehouden bij het bemonsteren in dit project.

Leeswijzer

Bij ieder van de twee onderzoeksvragen zijn verschillende micro-organismen interessant. Bij de onderzoeksvraag over de bodemgezondheid in de toplaag spelen soorten een rol die de agrariër helpen een zo gezond mogelijk gewas te laten groeien met een zo hoog mogelijke gewasopbrengst. Functies die hierbij horen zijn bijvoorbeeld stikstof fixatie, nitrificatie en het produceren van planthormonen. Bij de onderzoeksvraag over de veenafbraak zijn deze soorten niet (of minder) van belang, maar spelen juist soorten een rol die organisch materiaal af kunnen breken. Om deze reden wordt per onderzoeksvraag naar verschillende functies gekeken.

De resultatensectie van het rapport begint met het schetsen van een algemeen beeld van de microbiologie in de bodem van de verschillende veenlagen (clustering, biodiversiteit), hierbij wordt nog niet naar functies gekeken. Het rapport gaat daarna in op de eerste onderzoeksvraag over veenafbraak, waarbij soorten die de potentie hebben om veen af te breken in alle drie de bodemlagen worden onderzocht. Daarna volgt de tweede onderzoeksvraag over soorten die een rol spelen in bodemgezondheid. Hierbij is alleen de toplaag onderzocht.

2 Proefopzet

De proef in Koufurderrige bestaat uit in totaal 8 bemestingsbehandelingen met 5 herhaalde blokken (A-E) van minimaal 3 x 12 meter. In samenspraak met het LBI is besloten om van 4 bemestingsvormen (vaste mest, drijfmest, kunstmest en geen stikstofbemesting (controle) de toplaag te meten van een grasperceel in 3 herhalingen (Tabel 1). De totale stikstofgift van de plots waar drijfmest, kunstmest of vaste mest op is aangebracht is gelijk (170 kg N/ha, verdeeld over twee giften in maart/april en na de eerste snede).

De 3 herhalingen zijn gemeten in plots A, C en E van de proef. Van 2 bemestingsvormen (drijfmest en controle) zijn in twee herhalingen (plots A en E) aanvullend 2 diepere veenlagen in kaart gebracht: de mesotelm (~40-60 cm) en het catotelm (~80-100 cm).

De mesotelm is de scheidslijn tussen zwart-rood veen en is afwisselend verzadigd en onverzadigd, waardoor hier zowel aerobe als anaerobe omstandigheden voorkomen. De catotelm is permanent verzadigd en anaeroob.

Van ieder monster zijn de bacteriën, schimmels en archaea in de bodem in kaart gebracht middels Next Generation Sequencing (NGS) van de 16S en ITS regio's.

Tabel 1. Proefopzet metingen microbiologie.

Koufurderrige		
	Bemestingsproef	Veenafbraak
Dieptes	1	2
Herhalingen	3	2
Conditie • Vaste mest • Drijfmest • Kunstmest • Controle	4	2 (drijfmest en controle)
Totaal monsters	20	
Totaal datasets	20 * 3 (bacteriën, archaea, schimmels) = 60	

3 Bemonstering

De bemonstering heeft in de derde week van april 2024 twee weken na de eerste bemesting van het seizoen plaatsgevonden, gelijktijdig met de bemonstering van het LBI. Zowel in het najaar van 2023 als in de maanden januari, februari en april van 2024 is meer neerslag dan gemiddeld gevallen in het bemonsterde gebied (Bron: KNMI). Ondanks dat er geen bodemvocht metingen zijn verricht ten tijde van de bemonstering is het hierdoor aannemelijk dat de mesotelm en catotelm lagen verzadigd waren.

De bemonstering heeft zo steriel mogelijk plaatsgevonden en de monsters zijn in het veld direct geconserveerd in een EtOH-buffer oplossing. Voor de bemonstering van de toplaag is een guts van 30 cm lang en 1 cm breed gebruikt. De guts is voor iedere bemonstering gesteriliseerd met ethanol en per conditie is iedere eerste steek weggedaan om de gesteriliseerde guts te homogeniseren met de microbiologie die aanwezig is in de bodem. Per conditie is een mengmonster gemaakt van 4 steken van 0-25 cm. Hierbij is visueel bepaald of er veen in de steek zat en zo nodig is dit veen weggedaan. De diepere veenlagen zijn bemonsterd met een Edelman grondboor. De grondboor is voor iedere bemonstering gesteriliseerd met ethanol. De omhoog gehaalde bodem is uitgelegd op schoon plastic, waarnaar visueel de meso- en catotelm bepaald zijn. Vervolgens is met een steriele lepel een deel van het veen dat niet aan de lucht en het plastic is blootgesteld bemonsterd.

4 Resultaten

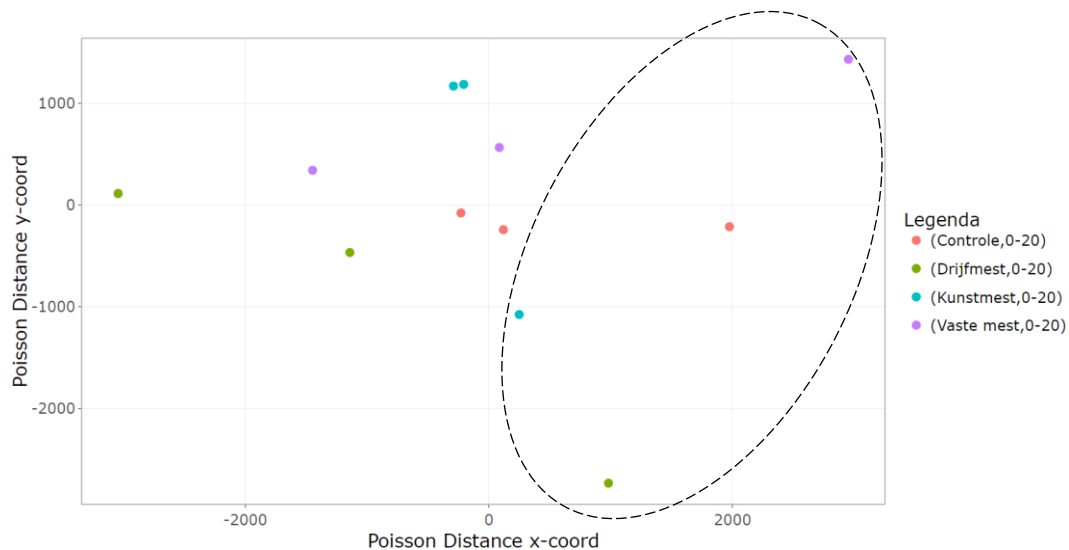
4.1 Clustering

0-25 cm

Voor ieder type micro-organisme (bacteriën, schimmels en archaea) is bepaald welke monsters het meest op elkaar lijken middels een multi-dimensional scaling (MDS) analyse. Deze analyse wordt gebruikt als eerste inzicht in de data. In de MDS bevat iedere stip informatie over de samenstelling van alle bacteriën, schimmels of archaea in het bodemonster.

Het valt op dat in de MDS van de bacteriën bij iedere mestsoort twee van de drie monsters bij elkaar liggen en dus op elkaar lijken, terwijl het derde monster rechts in de MDS wordt weergegeven (figuur 1, zie ovaal). Alle monsters in de ovaal behoren tot plot E. Dezelfde trend is te zien bij de schimmels en archaea (bijlage 2). Hieruit is af te leiden dat de microbiologie in blok E verschilt van blok A en C.

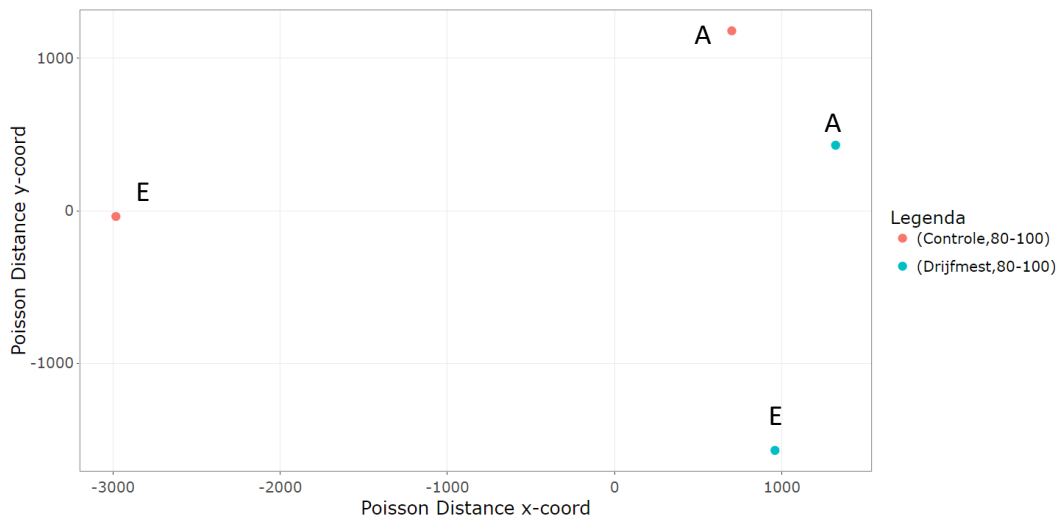
Aanvullend is uit de MDS af te leiden dat de kunstmest en controle monsters uit blok A en C dichter bij elkaar liggen -en dus meer op elkaar lijken- dan de drijfmest en vaste mest monsters. Mogelijk komt dit doordat organische mest een variabelere product is dan kunstmest (homogeen) en de controle waar geen N-bemesting wordt aangebracht. Soortgelijke trends zijn te zien voor de archaea en schimmels (bijlage 2).



Figuur 1. MDS analyse van de bacteriën in de top laag (0-25 cm). Alle monsters in de ovaal behoren tot plot E. Hoe groter de poisson-afstand, hoe meer de monsters van elkaar verschillen.

Mesotelm en catotelm

Ook in de diepere lagen is het verschil in de microbiologie van plot E duidelijk zichtbaar. Ter illustratie is in figuur 2 het MDS figuur van de bacteriën van 80-100 cm weergegeven. De overige MDS figuren zijn op aanvraag. In figuur 2 is te zien dat het controlemonster van plot A meer lijkt op het drijfmestmonster dan op het controlemonster van plot E. Dit effect is ook zichtbaar voor de archaea, maar niet voor de schimmels.



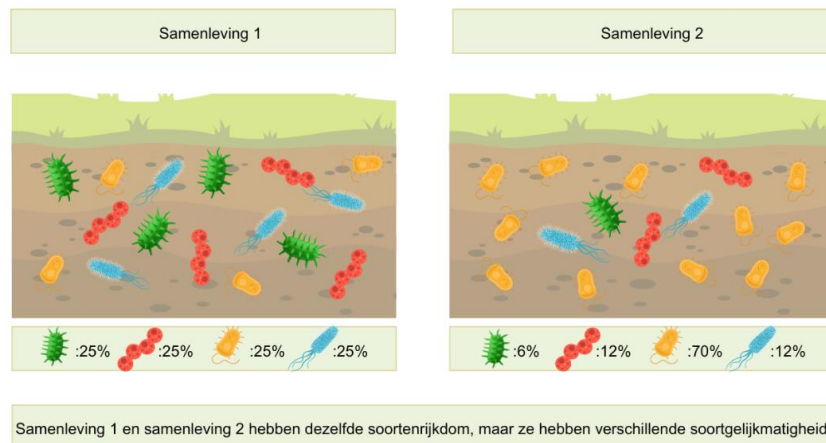
Figuur 2. De MDS analyse van de bacteriën in de diepste laag (catotelm). Hoe groter de poisson-afstand, hoe meer de monsters van elkaar verschillen.

Verkenkend onderzoek en interpretatie resultaten

De omvang van de proefopzet in combinatie met de variatie tussen de blokken maakt het statistisch onderbouwen van de resultaten in de rest van het rapport lastig, met name in de veenlagen. De resultaten in dit rapport zijn ter verkenning en er zijn meer data nodig om mogelijke trends te kunnen verifiëren.

4.2 Biodiversiteit

Microbiële biodiversiteit wordt vaak gebruikt als maatstaf voor de gezondheid van de bodem. Omdat biodiversiteit niet direct gerelateerd is aan de functies van de soorten die in de bodem zitten en er verschillen in (gemiddelde) biodiversiteit zitten tussen bijvoorbeeld grondsoorten en gewassen is er geen ideale biodiversiteit aan te wijzen. Wel geeft de biodiversiteit in combinatie met andere analyses inzicht in de staat van de bodem. De Shannon-index is een bekende index uit de ecologie die niet alleen rekening houdt met het totaal aantal soorten (*richness*) in de bodem, maar ook met hoe vaak deze soorten voorkomen (*evenness*). Dit concept is in figuur 3 gevisualiseerd: beide bodems bevatten evenveel unieke soorten, maar in de linker bodem zijn deze soorten evenrediger verdeeld. De linker bodem heeft daardoor een hogere Shannon-index dan de rechter bodem.

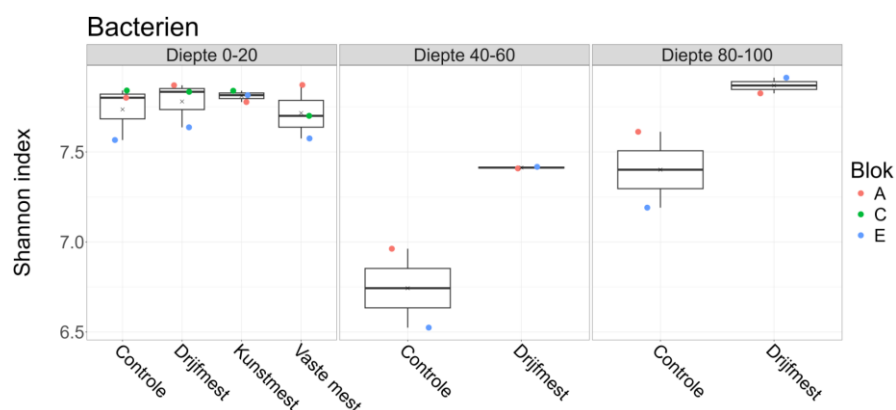


Figuur 3. Beide bodems bevatten evenveel unieke soorten bacteriën (4). De Shannon-index van samenleving 1 is hoger, omdat hier de soorten evenredig zijn verdeeld.

Biodiversiteit bacteriën

In figuur 4 is de biodiversiteit van de bacteriën in de verschillende bodemlagen weergegeven. Uit de statistiek blijkt dat in de toplaag het blok (A, C of E) significant invloed heeft op de Shannon-index (Anova toets, $p=0.049$). Omdat het blok significant effect heeft is er een tweede statistische toets uitgevoerd om te bepalen welke blokken significant van elkaar verschillen. Hieruit blijkt dat de Shannon-index van blok E significant (post-hoc, $p=0.037$) verschilt van blok A en enigszins verschilt van blok C ($p=0.078$). Er zijn geen statistisch significante verschillen in biodiversiteit tussen de mestbehandelingen in de toplaag.

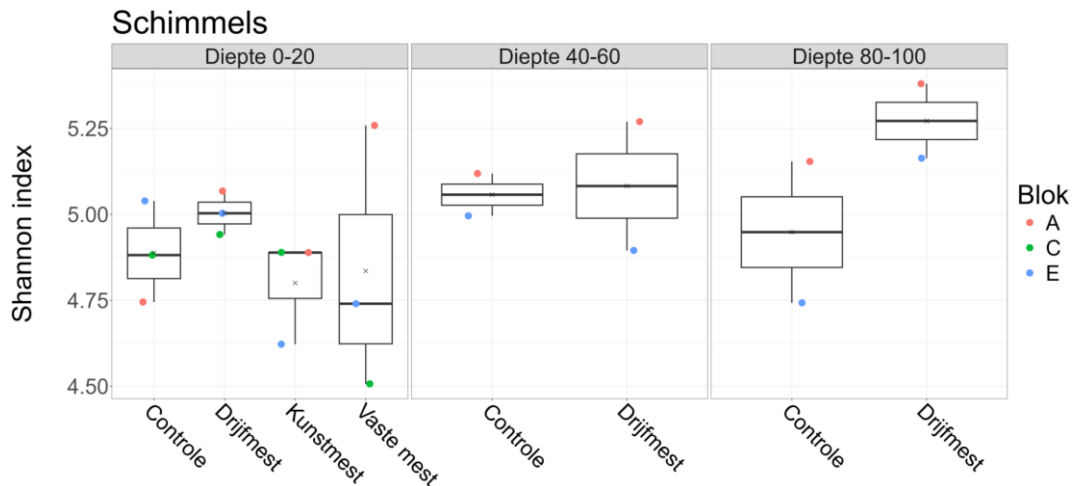
In de veenlagen lijkt sprake van een trend waarbij drijfmest zorgt voor een hogere bacterie biodiversiteit ten opzichte van de controlebehandeling. Deze verschillen zijn niet significant; desondanks zijn de verschillen in de veenlagen tussen de behandelingen op de logaritmische schaal van Shannon dusdanig groot dat een verschil veroorzaakt door bemesting aannemelijk is. Het verzamelen van meer data is nodig om te gevonden trends te verstevigen.



Figuur 4. De biodiversiteit (Shannon-index) van de verschillende bodemlagen.

Biodiversiteit schimmels

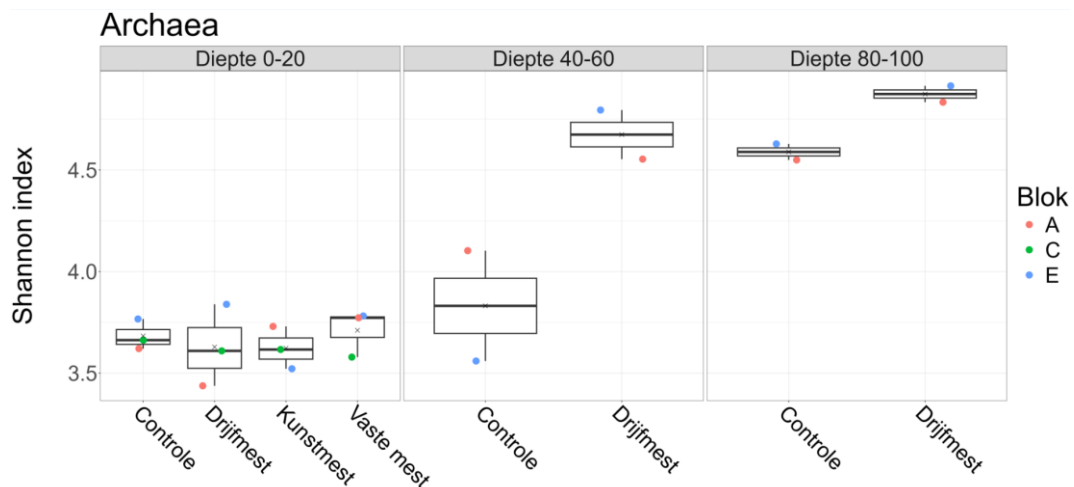
Er worden geen significante verschillen gevonden in de schimmeldiversiteit in de drie veenlagen in relatie tot bemesting of het blok (figuur 5). Het is opvallend dat in de drie bodemlagen een even hoge biodiversiteit aan schimmels wordt aangetroffen. Schimmels kunnen over het algemeen slecht tegen zuurstofloze omstandigheden, desondanks worden deze toch nog in de diepste laag aangetroffen. Het is interessant om te bepalen wat de absolute aantallen schimmels zijn (met qPCR) in aanvulling op de Shannon-index.



Figuur 5. De Shannon-index van de schimmels van de verschillende bodemlagen.

Biodiversiteit archaea

In de veenlagen wordt een hogere archaea biodiversiteit aangetroffen dan in de toplaag (figuur 6). Dit heeft er mogelijk mee te maken dat archaea beter kunnen overleven onder extreme omstandigheden. Er zijn geen statistische verschillen tussen de mestbehandelingen en de archaea. Wel lijkt er een trend te zijn waarbij drijfmest de biodiversiteit van archaea in de veenlagen stimuleert.



Figuur 6. De Shannon-index van de archaea van de verschillende bodemlagen.

Synthese biodiversiteit

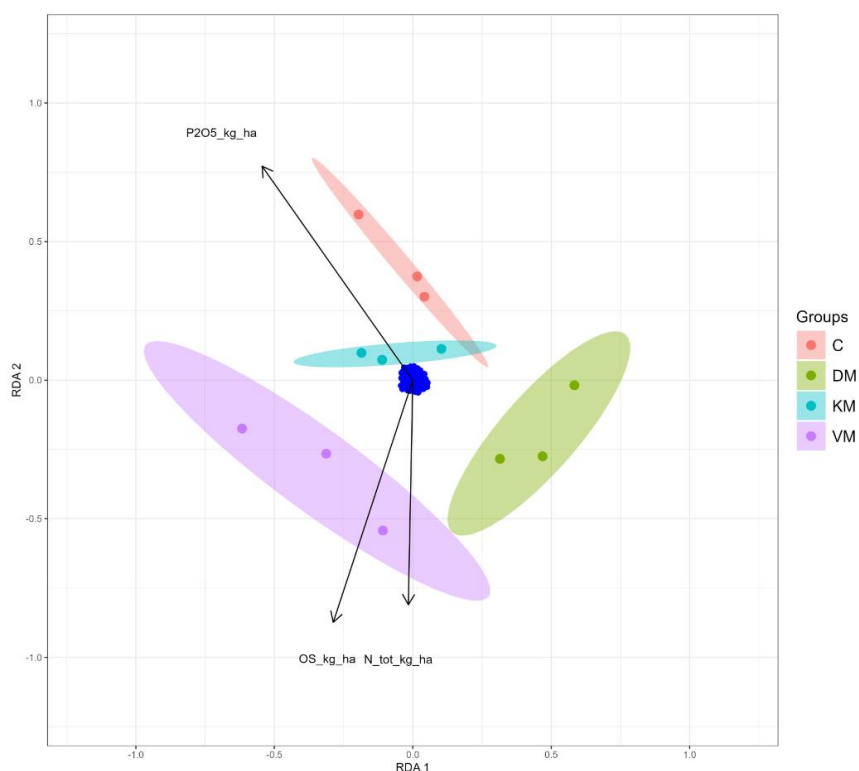
Ondanks dat er geen statistisch significante verschillen worden aangetroffen tussen de mestbehandeling en de biodiversiteit lijkt er wel een trend te zijn tussen bemesting en de microbiologie in de veenlagen. De hypothese dat bemesting invloed heeft op het veen wordt versterkt doordat in de diepste veenlaag (80-100 cm) hetzelfde patroon, waarbij de controle een lagere biodiversiteit heeft dan de drijfmestbehandeling, wordt gevonden voor zowel de bacteriën, archaea en de schimmels. Ook is een interessant resultaat van dit verkennende onderzoek dat in de diepe laag, waar zuurstofloze omstandigheden heersen, nog steeds een even hoge biodiversiteit aan schimmels wordt aangetroffen als in de toplaag. Voor meer inzicht in de biodiversiteit kan doormiddel van qPCR analyse de absolute aantallen schimmels, bacteriën en archaea worden bepaald.

4.3 De relatie tussen chemische en fysische parameters en de microbiologie

Het LBI heeft de chemische en fysische eigenschappen van de toplaag van de bodem, het gewas en de mest bepaald. De chemische bodemeigenschappen zijn middels RDA analyses (redundantie analyse) uitgezet tegen de samenstelling van de microbiologie in de bodem. Hiermee wordt inzichtelijk gemaakt welke chemische variabelen correleren met de microbiologie. Met andere woorden, de RDA analyse geeft inzicht of er een verband is tussen de chemische samenstelling van de bodem en de microbiologie. In deze analyse geeft iedere stip de samenstelling weer van de bacteriën, schimmels of archaea. De stippen “trekken” als het ware aan de pijlen. Een pijl die tussen twee groepen met stippen (monsters) instaat wordt door beide groepen evenveel beïnvloedt.

Uit de RDA analyse blijkt dat het microbioom van de vaste mest behandeling correleert met het organische stof gehalte in de bodem. Tevens correleren de microbiomen van de drijfmest en vaste mest behandelingen beide met de totale stikstofbodemvoorraad (figuur 7).

Tevens correleren de schimmels bij een behandeling met kunstmest met waterinfiltratie en bulkdichtheid (bijlage 3; figuur b6). Er zijn geen duidelijke correlaties gevonden tussen archaea en de chemie (bijlage 3; figuur b7).



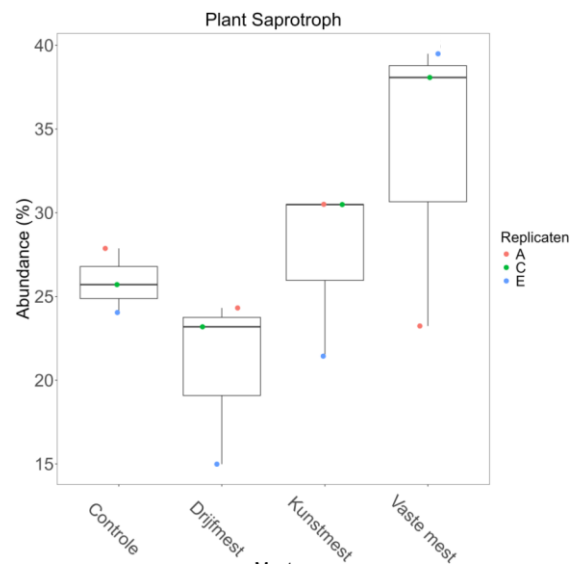
Figuur 7. RDA van de bacteriën. C = controle, DM = drijfmest, KM = kunstmest, VM = vaste mest.

4.4 Soorten in relatie tot veenafbraak

De soorten die een rol spelen in veenafbraak in de bodem behoren tot bacteriën die o.a. cellulose en lignine kunnen afbreken en de saprotrofe schimmels. Deze soorten zijn in kaart gebracht voor de drie bodemlagen. Een opvallend resultaat is dat mestbehandeling invloed heeft op het de aanwezigheid van soorten die veen kunnen afbreken.

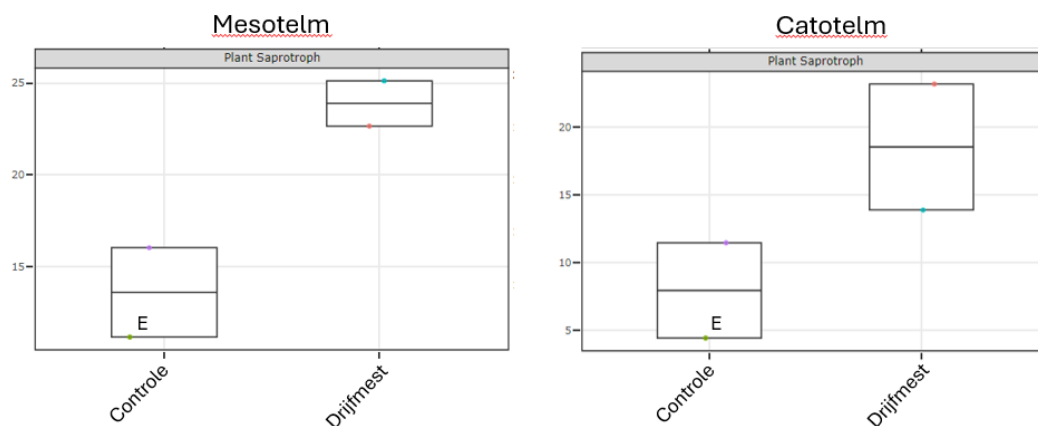
Saprotrofe schimmels

Bemesting met vaste mest lijkt het aandeel saprotrofe schimmels in de toplaag te stimuleren, al is het effect van bemesting in deze laag niet significant ($p=0.2$) (figuur 8). Het aantreffen van een hoger aandeel saprotrofe schimmels na bemesting met vaste mest ligt wel in lijn met de verwachting, omdat vaste mest onverteerd stro bevat waar deze schimmels op kunnen groeien.



Figuur 8. Het aandeel saprotrofe schimmels in de toplaag (0-25 cm) van de bodem.

In de mesotelm is het aandeel saprotrofe schimmels significant hoger bij bemesting met drijfmest ($p=0.028$, figuur 9). Hetzelfde patroon is aanwezig in de catotelm, maar dit is niet significant ($p=0.40$). Verder is het aandeel saprotrofe schimmels hoger in de mesotelm dan in de catotelm.

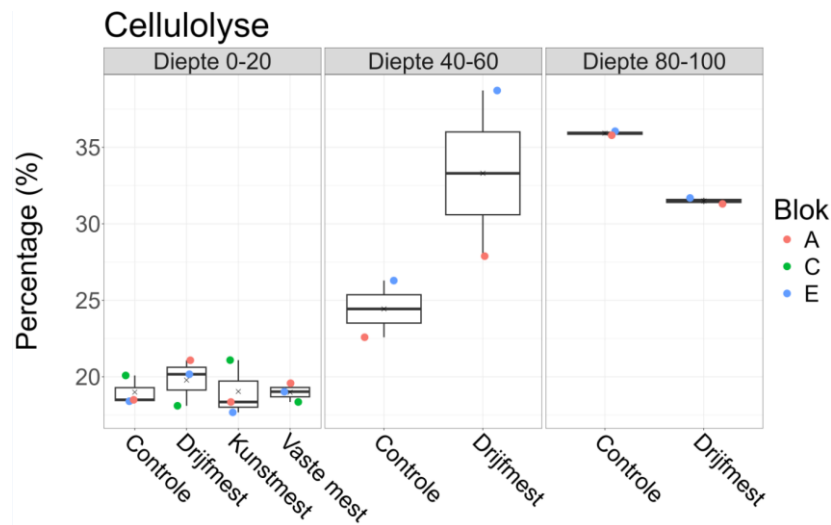


Figuur 9. Het aandeel saprotrofe schimmels in de veenlagen.

Cellulose afbrekende bacteriën

In de catotelm (80-100 cm) is een significant hoger aandeel cellulolytische bacteriën aangetroffen in de controlebehandeling ten opzichte van de drijfmestbehandeling (figuur 10, $p=0.009$). Dat deze soorten in hogere mate aangetroffen worden in de controle -waar geen stikstofbemesting plaatsvindt- is mogelijk positief voor agrariërs, omdat in de landbouw altijd bemesting met stikstof plaatsvindt. In de mesotelm is er een lichte trend waarbij drijfmest juist het aandeel cellulolytische bacteriën stimuleert ($p=0.24$). Mogelijk heeft bemesting een ander effect op de twee verschillende veenlagen. Een iets hoger aandeel cellulolytische bacteriën bij bemesting met drijfmest wordt ook aangetroffen in de toplaag (niet significant).

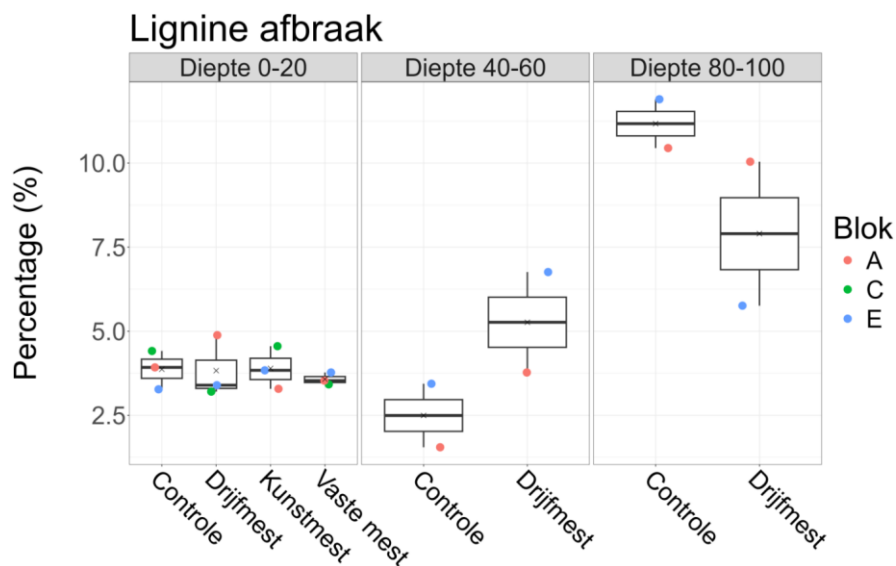
De hypothese dat bemesting de veenlagen verschillend beïnvloedt zou met meer data onderbouwd moeten worden.



Figuur 10. Het aandeel bacteroides, firmicutes, actinobacteria en proteobacteria in de bodem. Deze 4 phyla staan bekend om het produceren van cellulolytische enzymen.

Lignine afbrekende bacteriën

De lignine afbrekende bacteriën in de veenlagen volgen hetzelfde patroon als de cellulolytische bacteriën, waarbij in de mesotelm het aandeel lignolytische bacteriën hoger is na bemesting met drijfmest en in de catotelm het aandeel hoger is bij de controle (figuur 11). Deze verschillen zijn niet significant, wel is er in de mesotelm een trend waargenomen ($p=0.12$). Er wordt geen significant effect van de bemesting in de toplaag waargenomen.



Figuur 11. Het aandeel lignine afbrekende bacteriën in de verschillende dieptes.

Synthese veenafbraak

Bemesting lijkt een groter effect te hebben op de veenlagen dan op de toplaag wat betreft veenafbrekende schimmels en bacteriën. Het is opvallend dat in de mesotelm hetzelfde patroon (hoger aandeel soorten met de potentie om veen af te kunnen breken bij bemesting met drijfmest) wordt waargenomen voor beide type micro-organismen. Dit verschil is voor de saprotrofe schimmels ook significant.

In de permanent verzadigde zone van het veen, de catotelm, is een omgekeerde trend zichtbaar: bacteriën met de potentie om veen af te kunnen breken lijken juist minder aanwezig na bemesting met drijfmest (significant voor cellulolytische bacteriën). Hierdoor ontstaat de hypothese dat bemesting de twee veenlagen mogelijk anders beïnvloedt, meer data zijn nodig om hier beter onderbouwde uitspraken over te kunnen doen.

4.5 Soorten in relatie tot bodemgezondheid in de toplaag

Schimmels en bacteriën in het bouwvoor (0-25 cm) spelen een belangrijke rol in de kwaliteit van de bodem en de gezondheid van het gewas. Er zijn verschillende manieren waarop micro-organismen dit kunnen doen, bijvoorbeeld door het produceren van plantengroeihormonen en antibiotica tegen ziekteverwekkers, of het beschikbaar maken van voedingsstoffen zoals stikstof, fosfaat en ijzer. Het aandeel soorten (%) dat een rol speelt in plantgezondheid en de nutriëntenkringlopen is voor de toplaag per bemestingsvorm bepaald.

4.5.1 De stikstofkringloop

In de stikstofkringloop spelen bacteriën en archaea een belangrijke rol. Archaea zijn net als bacteriën eencellige organismen en spelen met name een rol in de stikstofkringloop en het produceren van methaan. In landbouwbodems hebben nitrificerende archaea de overhand, waarbij ze soms aandelen tot 98% van het totaal aan archaea halen, terwijl nitrificerende bacteriën vrijwel altijd onder de 4% van het totaal aan bacteriën blijven. Achtergrondinformatie over de rol die bacteriën en archaea spelen in de stikstofkringloop is te vinden in bijlage 4.

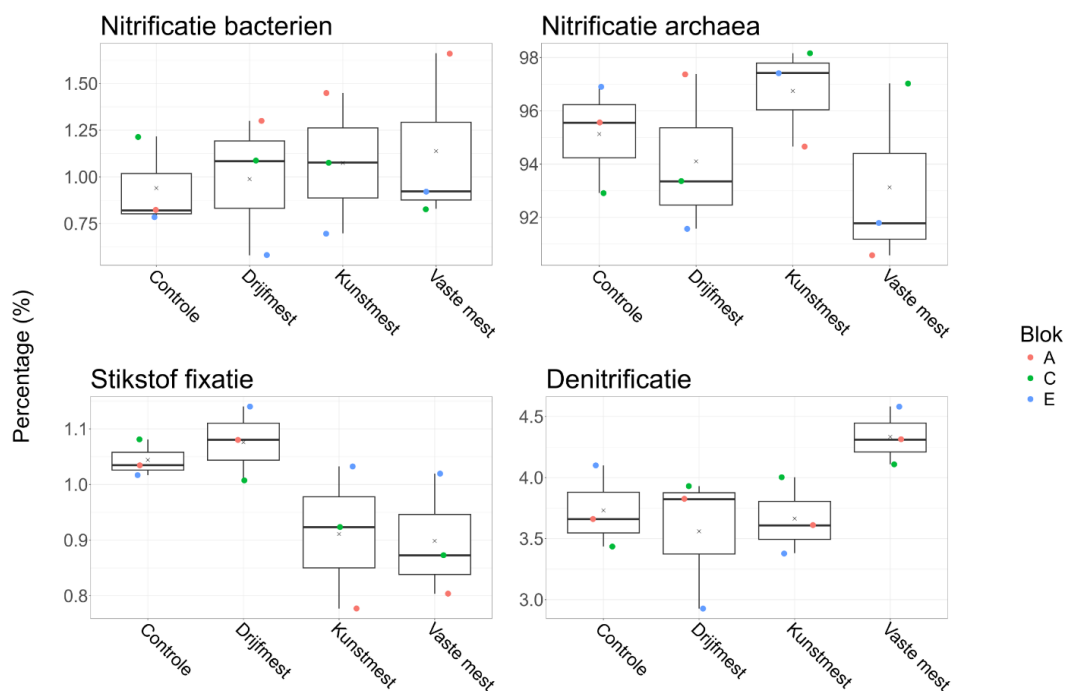
Nitrificatie: omzetting van ammonium naar nitraat

In de toplaag is geen significant effect van bemesting op nitrificerende bacteriën waargenomen, hierbij speelt de variatie tussen de blokken ook een rol ($p=0.07$) (figuur 12). Een verklaring hiervoor is een verschil in pH tussen de blokken: nitrificerende bacteriën gedijen het beste onder neutrale pH en nitrificatie neemt af wanneer de pH daalt (Le *et al.*, 2019). Plot E heeft een significant lagere pH dan plot A ($p=0.015$). Dit beïnvloedt het aandeel nitrificerende organismen. Zie bijlage 5 voor een visuele weergave van het verband tussen nitrificerende bacteriën en de pH.

Ondanks de verschillen in pH lijkt bemesting wel invloed te hebben op de nitrificerende bacteriën in de toplaag. De verschillen liggen in lijn met de theoretische verwachting en kunnen onderbouwd kunnen worden met de chemische data van het LBI: het hoogste aandeel bacteriën dat kan nitrificeren wordt gevonden in de drijfmest- en kunstmestvakken. Dit is naar verwachting, omdat een hogere concentratie stikstof (ammonium) in de bodem nitrificatie stimuleert.

Uit de chemische data van het LBI blijkt dat de ammonium concentraties in de drijfmest hoger zijn dan in de vaste mest (respectievelijk 42 kg/ha en 12.6 kg/ha).

De archaea laten een andere trend zien (figuur 12), waarbij de kunstmestbehandeling het hoogste aandeel nitrificerende archaea heeft, gevolgd door de controle (niet significant). Het enzym dat een rol speelt in nitrificatie van archaea heeft een hogere affiniteit voor ammonium dan het enzym van bacteriën. Hierdoor hebben nitrificerende archaea de overhand in bodems waar de ammoniumconcentraties laag zijn (Wright & Lehtovirta-Morley, 2023). Dit is het geval in de controlevakken, maar valt niet te verwachten in de vakken waar kunstmest is uitgereden. Mogelijke verklaringen hiervoor kunnen zijn dat de kunstmest al grotendeels was opgenomen door het gras, uitspoeling door regen of nog onbekende interacties tussen kunstmest en nitrificerende archaea. Meer data is nodig om de mogelijke verschillen statistisch te kunnen onderbouwen en de hiervoor genoemde hypothesen te kunnen onderzoeken.



Figuur 12. Overzichtspanel met de verschillende onderdelen van de stikstofkringloop. Deze functies zijn bepaald voor de toplaag (0-25 cm).

Stikstof vastlegging (fixatie)

Het vastleggen van stikstofgas (N_2) uit de lucht in de bodem heet stikstof fixatie. Het microbieel vastleggen van stikstof is voordelig voor agrariërs, omdat stikstof die op deze manier in de bodem komt niet met kunstmest aangebracht hoeft te worden. Stikstof fixerende bacteriën leven in symbiose met wortelknobbeltjes van onder andere klaver, maar er zijn ook soorten die vrij levend zijn.

Er is een sterke trend waarneembaar waarbij bemesting effect op het aandeel stikstof vastleggende soorten (Anova, $p=0.06$) (figuur 12). Omdat de Anova test niet significant is mag niet getest worden welke mestbehandelingen de verschillen veroorzaken. Er lijkt een trend te zijn waarbij, tegen verwachting in, het hoogste aandeel stikstof fixerende bacteriën worden gevonden in de plot die bemest wordt met drijfmest, gevolgd door de controle plot. Drijfmest bevat makkelijker beschikbare vormen van stikstof ten opzichte van vaste mest; over het algemeen remt dit stikstof fixatie, omdat hogere concentraties stikstof in de bodem een remmend effect hebben op het enzym dat stikstof uit de lucht vastlegt in de bodem.

Denitrificatie

Denitrificerende bacteriën kunnen nitraat omzetten in stikstofgas (N_2) en het sterke broeikasgas lachgas (N_2O). Denitrificatie is het verlies van stikstof uit de bodem naar de lucht en is daarom onwenselijk voor agrariërs. Uit de meting blijkt dat bodems die bemest worden met vaste mest het hoogste aandeel soorten met de potentie om te denitrificeren bevat (niet significant) (figuur 12). Een opmerking hierbij is dat dit met name de positieve soorten *Candidatus_solibacter* en *Haliangium* zijn. *Candidatus_solibacter* komt ook meer voor in rijstvelden waar stro wordt aangebracht als microbiom verbeterende maatregel (Yu *et al.*, 2019). De soort *Haliangium* wordt gelinkt aan bodemkwaliteit (Lee *et al.*, 2022). Aangezien stikstof uit vaste mest langzaam vrij komt is het mogelijk dat de meeste beschikbare stikstof opgenomen wordt door het gewas voordat het omgezet kan worden door denitrificerende organismen. Het is mogelijk dat de gevonden denitrificerende soorten ook andere belangrijke rollen in de bodem vervullen.

Synthese stikstofkringloop

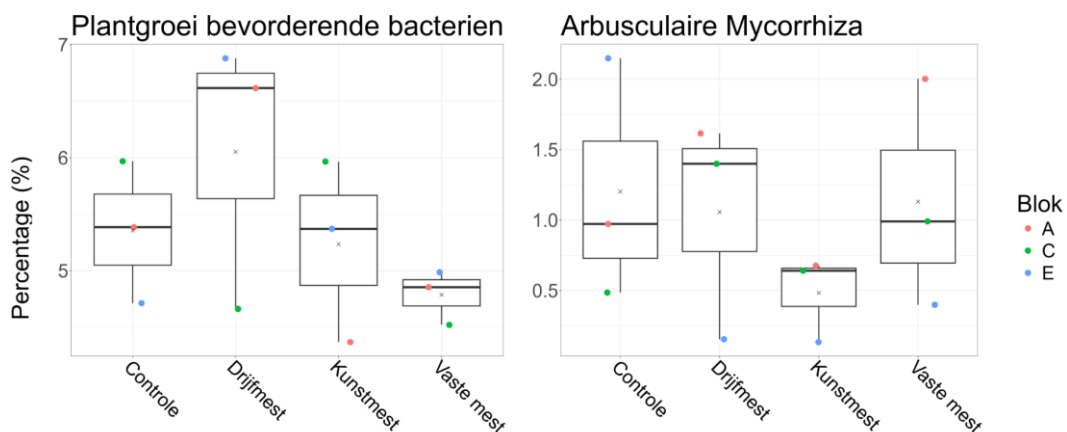
Uit de data van de stikstofkringloop blijkt dat een verschil in pH tussen de blokken invloed heeft op de microbiologie. Hierdoor ontstaat variatie en kunnen de data minder goed statistisch onderbouwd worden. Desondanks zijn er trends waargenomen die overeenkomen met wat op basis van theorie en literatuur kan worden verwacht:

- Het is bekend dat bij een lagere pH minder nitrificatie plaatsvindt. Respectievelijk worden in blok E (laagste pH) en blok A (hoogste pH) de laagste en hoogste aandelen nitrificerende bacteriën gevonden. Deze resultaten pleiten ervoor dat in blok E minder nitrificatie plaatsvindt dan in blok A, wat naar verwachting is.
- Er worden hogere aandelen nitrificerende bacteriën aangetroffen na bemesting met drijfmest en kunstmest. Deze vormen van bemesting leveren sneller beschikbare vormen van stikstof ten opzichte van vaste mest en controle (geen stikstof), waardoor meer nitrificatie -en dus een hoger aandeel nitrificerende bacteriën- worden verwacht.
- In het controleperceel vindt geen stikstofbemesting plaats. Omdat stikstof de vastlegging van stikstof door stikstof-fixerende bacteriën remt, wordt verwacht dat in het blok waar géén stikstofbemesting plaatsvindt een hoger aandeel stikstof vastleggende soorten wordt aangetroffen. De controleplot bevat de minste spreiding in stikstofvastleggende soorten en bevat gemiddeld een hoger aandeel van deze soorten dan de vaste mest en kunstmest plots.

4.5.2 Plantgroei bevorderende soorten

Bacteriën

Plantgroei bevorderende bacteriën (PGBB) zijn soorten die eigenschappen hebben zoals het produceren van planthormonen en het produceren van antibiotica tegen ziekteverwekkers. Er wordt geen significant effect van bemesting waargenomen ($p=0.46$, figuur 13). Er lijkt mogelijk wel een trend waarbij drijfmest zorgt voor het hoogste aandeel plantgroei bevorderende bacteriën, dit moet bevestigd worden met meer data.



Figuur 13. Overzichtspanel van plantgroei bevorderende bacteriën (links) en positieve arbusculaire mycorrhizaschimmels (rechts).

Schimmels

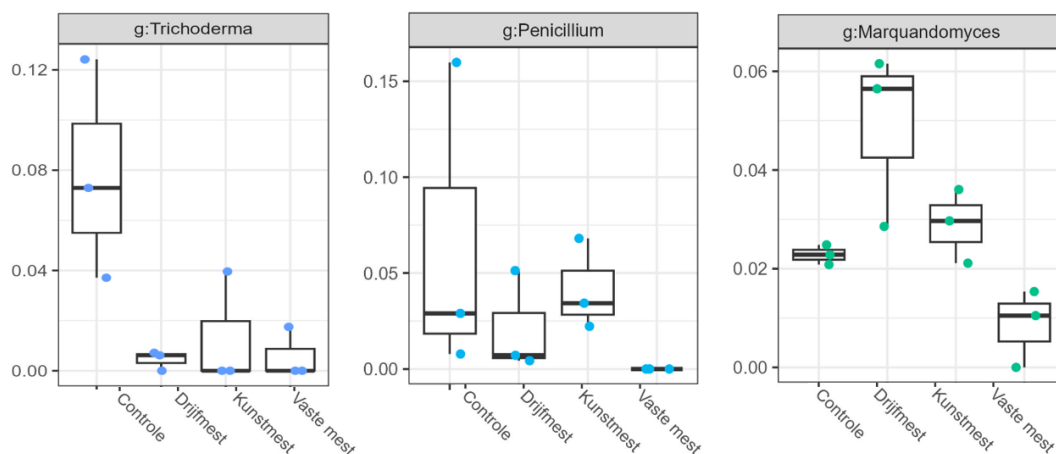
Een van de meest bekende plantengroei bevorderende schimmels zijn de *Arbusculaire mycorrhiza* (AM) schimmels. Deze schimmels kunnen een samenwerking aangaan met de wortels van een groot aantal gewassen, waaronder gras, mais en aardappel. De AM-schimmels vergroten het worteloppervlakte en zorgen voor een verbeterde opname van voedingsstoffen en bescherming tegen ziekteverwekkers en droogte- en zoutstress (Begum et al., 2019).

Er wordt geen statistisch significant effect van bemesting op de AM gevonden ($p=0.66$). Er lijkt wel een trend te zien waarbij de blokken die bemest zijn met kunstmest de laagste aandelen AM bevatten.

Ook andere schimmels hebben plantgroei bevorderende eigenschappen. Het genus *Metarhizium* is een zogeheten 'bio-control agent' en bevat soorten die ziekteverwekkende insecten en nematoden kunnen bestrijden, maar heeft ook plantgroei bevorderende eigenschappen (St. Leger & Wang, 2020). Verwant aan deze soort is *Marquandomyces*, welke ook antimicrobiële eigenschappen heeft (Zheng et al., 2024). *Penicillium* staat bekend om de productie van het antibioticum penicilline, maar kan ook nutriënten zoals fosfaat beschikbaar maken en abiotische stress verlichten in planten (Srinivasan et al., 2020). Het genus *Trichoderma* wordt door sommige agrariërs aangebracht vanwege zijn eigenschappen om ziekteverwekkers te onderdrukken en plantgroei te bevorderen (Zin & Badaluddin, 2020).

De bovengenoemde schimmels komen naar voren uit een statistische analyse (multi-level pattern analyse) als statistisch significant verschillend in één van de mestsoorten. Deze statistische analyse is gevisualiseerd in figuur 14. In de visualisatie zijn de ASVs (unieke soorten) die significant verschillen voor ieder genus bij elkaar opgeteld per mestsoort. Dit is anders dan het totaal aandeel *Penicillium* (en *Trichoderma*) in de bodem (bijlage 6).

Een aantal *Trichoderma* soorten komen meer voorkomen bij de controle (figuur 12). Bepaalde *Penicillium* soorten komt minder voor bij de behandeling met vaste mest. De aan *Metarhizium* verwante soort *Marquandomyces* komt het meest voor bij de behandeling met drijfmest (figuur 14).



Figuur 14. Visuele weergave van het aandeel (%) plantgroeibevorderende schimmels die statistisch significant verschillen tussen de verschillende bemestingsvormen. Het gaat hierbij om specifieke soorten (unieke stukken DNA; ASVs) die verschillen.

5 Conclusie en discussie

Dit onderzoek betreft een eerste inventarisatie van het meten van de microbiologie in het veenweidegebied om te zien of dit iets kan vertellen over veenafbraak. De data laten een aantal trends zien die de moeite waard zijn om nader te onderzoeken om deze met meer zekerheid te kunnen onderbouwen. Zo wijzen de resultaten erop dat bemesting invloed heeft op de soorten die een rol spelen in veenafbraak, met name in de veenlagen. De correlatie tussen soorten met de potentie om veen af te kunnen breken en bemesting is voor zover ons bekend nog niet eerder gevonden en kan mogelijk leiden tot een interessante handelingsperspectieven voor agrariërs om veenafbraak tegen te gaan door aanpassingen in bemesting. Zo lijkt drijfmest saprotrofe schimmels in de veenlagen te stimuleren. Op de bacteriën met potentie om veen af te kunnen breken lijkt drijfmest in de twee veenlagen (mesotelm en catotelm) een verschillend effect te hebben. Het is nog onbekend in welke mate deze schimmels en bacteriën bijdragen aan de afbraak van veen, het is nuttig om dit verder te onderzoeken.

Bij het analyseren van de data viel op dat er variatie zit tussen de blokken A, C en E die onder andere worden veroorzaakt door een verschil in pH. Met name blok E viel op als uitschieter. Vanwege de omvang van de proef was het mede hierdoor lastig om statistisch significante verschillen te vinden. Desondanks zijn er een aantal opvallende trends gevonden die interessant zijn om verder te onderzoeken. Hieronder worden puntsgewijs de meest belangrijke resultaten en hypothesen per onderzoeksvraag opgesomd:

Veenafbraak

- In de bodem worden op alle drie de dieptes soorten aangetroffen die de potentie hebben om veen af te kunnen breken in de vorm van saprotrofe schimmels en bacteriën die lignine of cellulose af kunnen breken.
- De hoogste microbiële diversiteit wordt gevonden in de diepste laag (80-100 cm) bij bemesting met drijfmest. Uit onderzoek naar verdroging van veen blijkt dat verschillen in diversiteit aanknopingspunten bieden voor de monitoring van veenafbraak.
- Drijfmest lijkt een groter effect te hebben op de veenlagen dan op de toplaag.
- Bemesting heeft mogelijk een verschillend effect mesotelm dan op de catotelm.
- Bij bemesting met drijfmest is het aandeel schimmels met veenafbrekende eigenschappen, de saprotrofen, significant hoger in de mesotelm. Ook lijkt het aandeel cellulolytische en lignolytische bacteriën in de mesotelm gestimuleerd te worden door drijfmest (niet significant).

Bemesting in relatie tot bodemgezondheid

Uit de data blijkt dat een significant verschil in pH tussen de blokken invloed heeft op de microbiologie die een rol speelt in de stikstofkringloop. Hierdoor ontstaat variatie en kunnen de data minder goed statistisch onderbouwd worden.

Desondanks zijn er trends waargenomen die overeenkomen met wat op basis van theorie en literatuur kan worden verwacht:

- Er worden hogere aandelen nitrificerende bacteriën aangetroffen na bemesting met drijfmest en kunstmest. Deze vormen van bemesting leveren sneller beschikbare vormen van stikstof ten opzichte van vaste mest en controle (geen stikstof), waardoor meer nitrificatie -en dus een hoger aandeel nitrificerende bacteriën- worden verwacht.
- De controleplot bevat gemiddeld een hoger aandeel stikstofvastleggende soorten dan de vaste mest en kunstmest plots, tevens is de spreiding binnen de controleplot het kleinst. In het controleperceel vindt geen stikstofbemesting plaats. Omdat stikstof de vastlegging van stikstof door stikstof-fixerende bacteriën remt, is het resultaat in lijn der verwachting.
- Bemesting zorgt voor een verschil in de samenstelling van plantgroeibevorderende schimmels. Uit statistische analyse blijkt dat een aantal *Trichoderma* soorten meer voorkomen meer bij de controle. Specifieke *Penicillium* soorten komt minder voor bij de behandeling met vaste mest. De aan *Metarhizium* verwante soort *Marquandomyces* komt het meest voor bij de behandeling met drijfmest.

Aanbevelingen

De resultaten van dit verkennende onderzoek laten zien dat veenafbrekende micro-organismen aangetoond kunnen worden in verschillende bodemlagen en dat bemesting invloed heeft op deze soorten. Het is nog onbekend in hoeverre er veenafbraak plaatsvindt in het gemeten gebied en of dit verschilt tussen de verschillende mestplots. Om de microbiële samenstelling te kunnen koppelen aan veenafbraak is het nodig om een referentiekader te creëren van de samenstelling van de microbiële gemeenschap van veen in het Friese veenweidegebied. Om tot een referentiekader te komen moeten bodems waarvan bekend is dat er veenafbraak plaatsvindt worden vergeleken met bodems waar geen afbraak plaatsvindt. Door met statistiek te onderzoeken welke soorten bacteriën en schimmels verschillen tussen de bodems kunnen mogelijk microbiële indicatoren ontwikkeld worden voor veenafbraak. Deze indicatoren kunnen onderdeel worden van een (qPCR) quick-scan om de effecten van beheersmaatregelen, zoals bemesting, te duiden.

De gebruikte methode in dit onderzoek, NGS, werkt met relatieve getallen (%), hierdoor kunnen de aandelen bacteriën, archaea en schimmels in kaart worden gebracht. Het is mogelijk dat de absolute biomassa tussen de verschillende behandelingen en in de verschillende veenlagen niet gelijk is. Het is daarom aan te raden om naast NGS ook qPCR analyses uit te voeren op de absolute aanwezigheid van bacteriën en schimmels.

De proef van het Louis Bolk bestaat uit vijf herhalingen, waarvan er in dit verkennende onderzoek drie zijn bemonsterd. Vanwege de variatie binnen de blokken is aan te raden om meer herhalingen te bemonsteren. Aanvullend is voor een vervolg aan te bevelen om per proefvak minimaal *in duplo* te bemonsteren, om de resultaten beter statistisch te kunnen onderbouwen. Daarnaast is in het parallel-onderzoek in Aldeboarn – De Deelen aangetoond dat de microbiologie in de verschillende veenlagen door het seizoen heen verschilt; daarom is ook aan te bevelen om op meerdere momenten door het seizoen heen te meten. In het geval van het meten aan een bemestingsproef is het nuttig om hierbij rekening te houden met de momenten van de mestgiften en bijvoorbeeld voor- en na de mestgift te meten.

Bijlagen

Bijlage 1	Literatuur
Bijlage 2	MDS schimmels en archaea 0-25 cm
Bijlage 3	RDA analyse chemie
Bijlage 4	Achtergrondinformatie stikstofkringloop
Bijlage 5	Correlatie nitrificerende bacteriën en pH
Bijlage 6	Penicillium

Bijlage 1 Literatuur

Agbor, V., Carere, C., Cicek, N., Sparling, R., & Levin, D. (2014). Biomass pretreatment for consolidated bioprocessing (CBP). *Advances in biorefineries*, 234-258.

Emsens, WJ., van Diggelen, R., Aggenbach, C.J.S. *et al.* Recovery of fen peatland microbiomes and predicted functional profiles after rewetting. *ISME J* **14**, 1701–1712 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0639-x>

Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., .. & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 10, 1068.

Birnbaum, C., Wood, J., Lilleskov, E., Lamit, L. J., Shannon, J., Brewer, M., & Grover, S. (2023). Degradation reduces microbial richness and alters microbial functions in an Australian peatland. *Microbial ecology*, 85(3), 875-891.

Le, T. T. H., Fettig, J., & Meon, G. (2019). Kinetics and simulation of nitrification at various pH values of a polluted river in the tropics. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 19(1), 54-65.

Lee, S. K., Chiang, M. S., Hseu, Z. Y., Kuo, C. H., & Liu, C. T. (2022). A photosynthetic bacterial inoculant exerts beneficial effects on the yield and quality of tomato and affects bacterial community structure in an organic field. *Frontiers in Microbiology*, 13, 959080.

Srinivasan, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). *Penicillium*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 651-667). Academic Press.

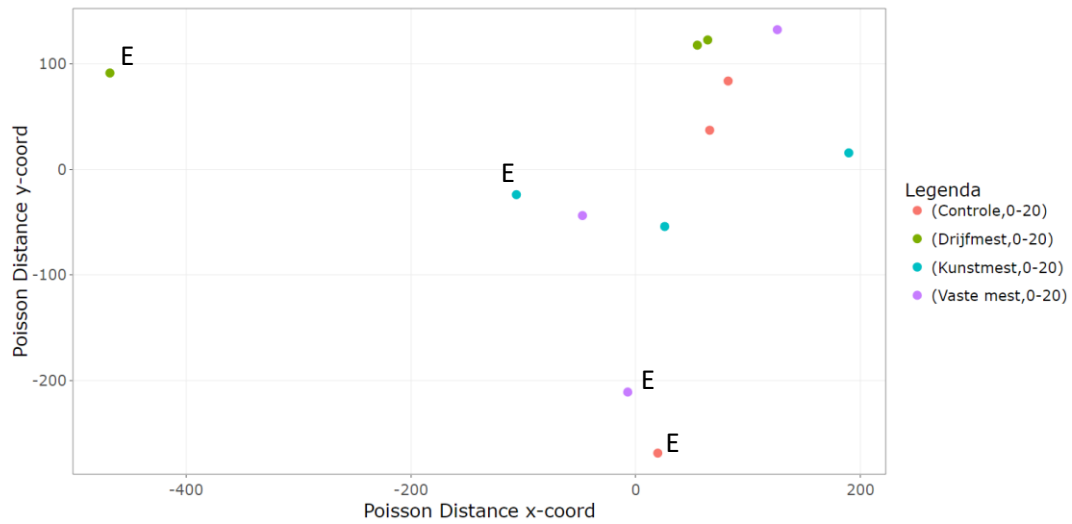
Wright, C.L., Lehtovirta-Morley, L.E. Nitrification and beyond: metabolic versatility of ammonia oxidising archaea. *ISME J* **17**, 1358–1368 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01467-0>

Yu, Y., Wu, M., Petropoulos, E., Zhang, J., Nie, J., Liao, Y., ... & Feng, Y. (2019). Responses of paddy soil bacterial community assembly to different long-term fertilizations in southeast China. *Science of the total environment*, 656, 625-633.

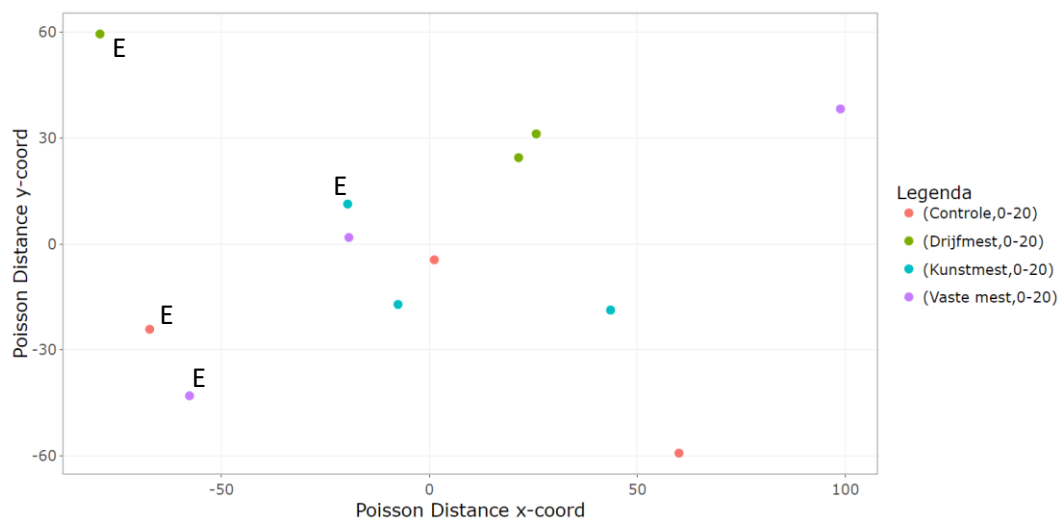
Zheng, X., Zhang, B., Shi, F., Chen, Y., & Zhao, X. (2024). Effects of *Marquandomyces marquandii* SGSF043 on Maize Growth Promotion and Soil Enzyme Activity. *Seeds*, 3(2), 203-215.

Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.

Bijlage 2 MDS schimmels en archaea 0-25 cm

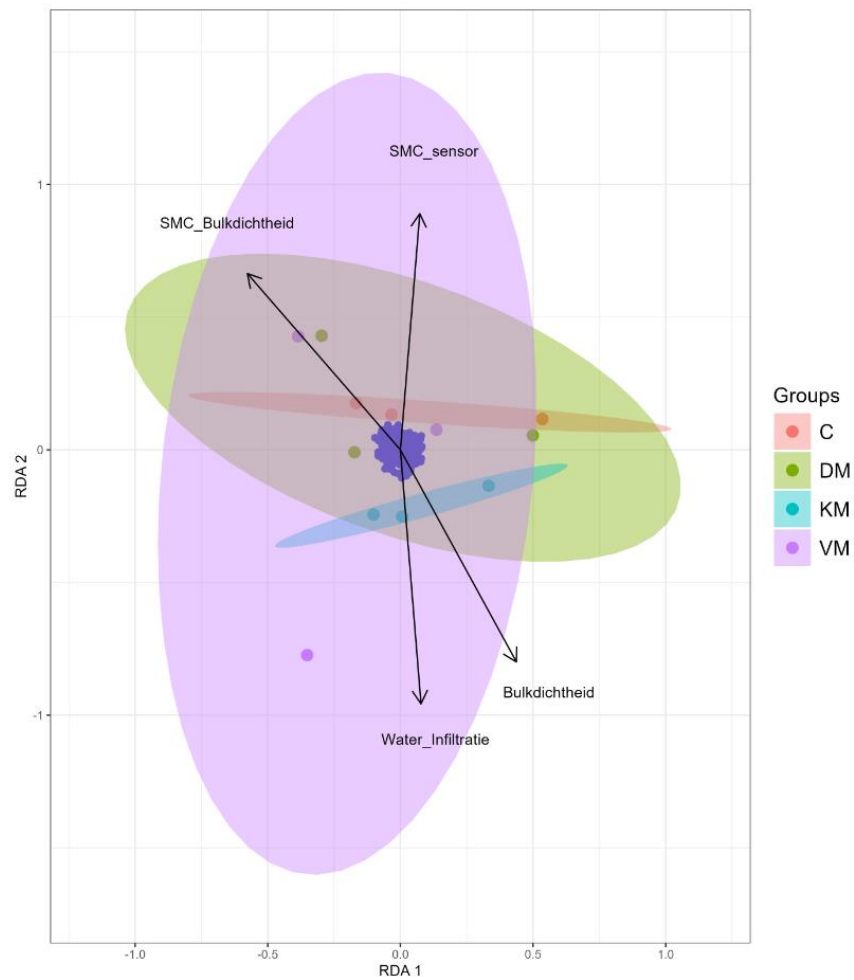


B 1. MDS van de schimmels.

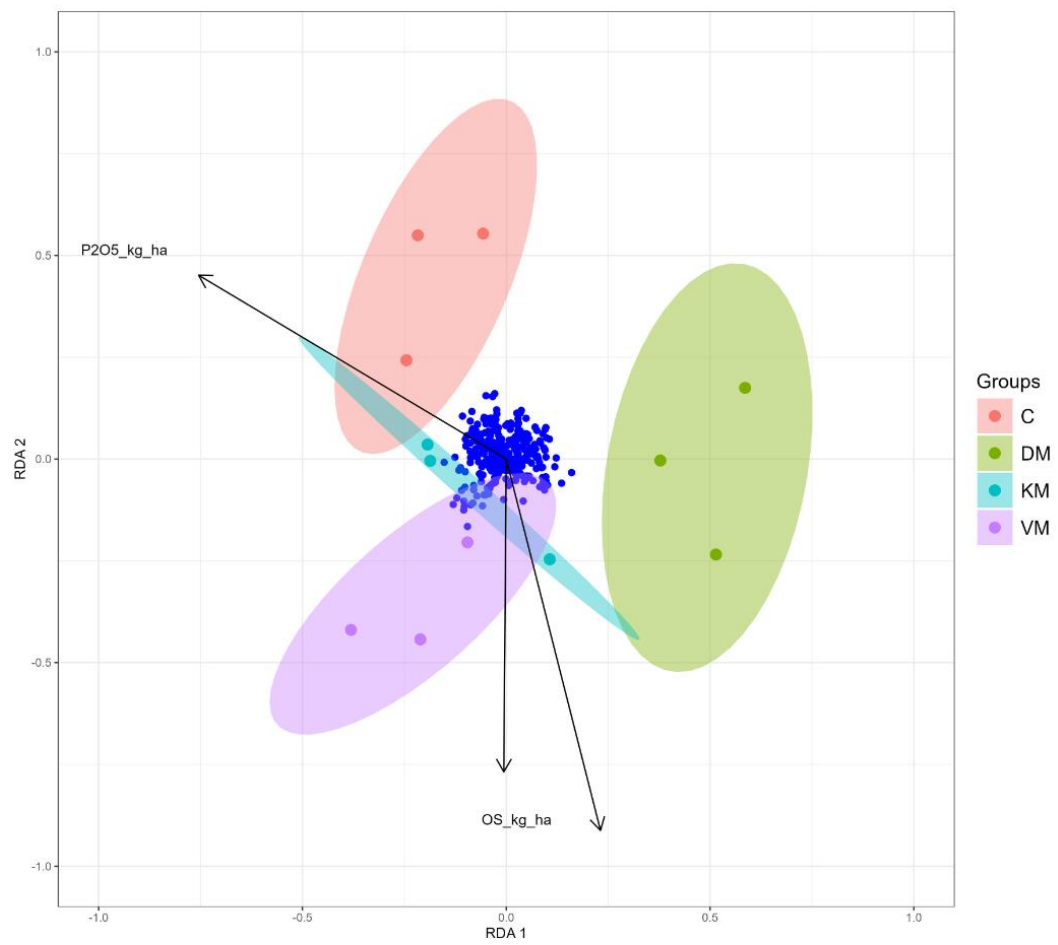


B 2. MDS van de archaea.

Bijlage 3 RDA analyse chemie



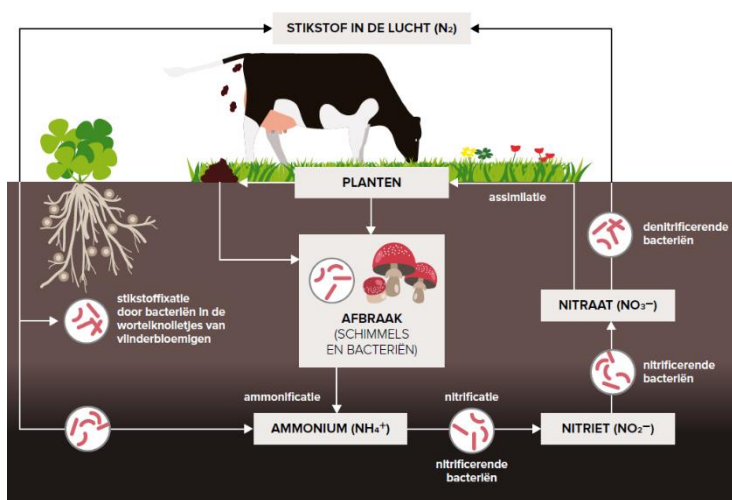
B 3. RDA analyse van de schimmels.



B 4. RDA van de archaea in de bodem.

Bijlage 4 Achtergrondinformatie stikstofkringloop

Al het leven heeft het element stikstof (N) nodig. Daarmee speelt dus alles wat leeft een rol in de stikstofkringloop. In het figuur is een versimpelde weergave van deze kringloop weergegeven. Hierin wordt meteen duidelijk dat micro-organismen belangrijke spelers zijn. Ze zijn betrokken bij de vastlegging vanuit de lucht, de afbraak van organisch materiaal waarbij ammonium en nitraten vrijkomen, en het omzetten van bijvoorbeeld ammonium in nitraat. Het feit dat stikstof in vele vormen voorkomt en op meerdere manieren kan worden omgezet maakt de kringloop redelijk complex.



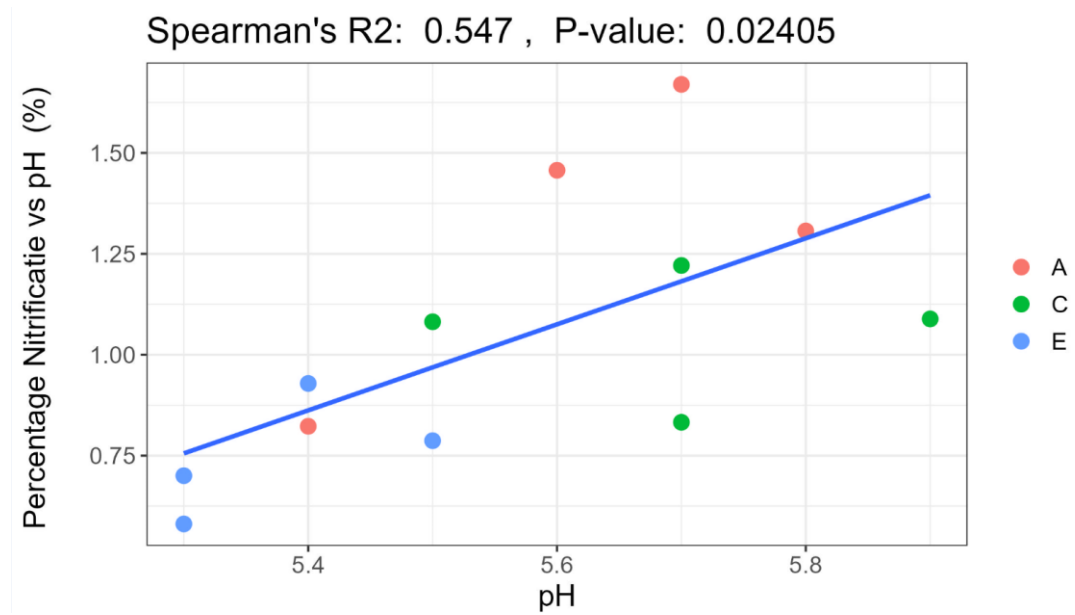
Het is bekend welke soorten bacteriën en archaea betrokken zijn bij ieder onderdeel van de stikstofkringloop. Om de invloed van bedrijfsvoering op deze soorten te onderzoeken, is het aandeel van deze soorten in de bodem bepaald. Op deze manier zijn de verschillende processen in de stikstofkringloop te volgen en wordt het effect van bedrijfsvoering op de organismen betrokken bij de stikstofkringloop inzichtelijk.

De bodemmicrobiologie is een dynamisch systeem dat zich goed kan aanpassen aan de omstandigheden in de bodem: wanneer er minder stikstof in de bodem beschikbaar is zullen bacteriën die stikstof (N_2) kunnen vastleggen uit de lucht in aantal toenemen en wanneer er meer stikstof aanwezig is zullen de micro-organismen die stikstof (ammonium) kunnen omzetten in nitraat (nitrificeerders) toenemen (Volkogon et al., 2021). Om deze reden geeft het bepalen van het aantal micro-organismen die gelinkt zijn aan een bepaalde functie een goed beeld van wat er in de bodem gebeurt.

Nitrificatie en denitrificatie

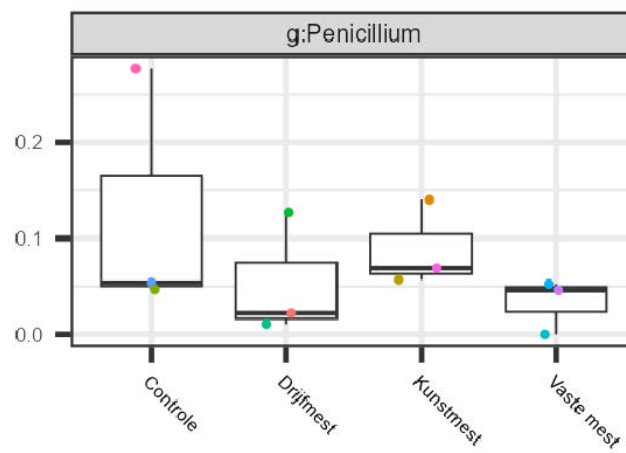
Nitrificatie is het proces waarbij ammonium door bacteriën en archaea wordt omgezet in nitraat. Nitraat is een vorm van stikstof die goed opneembaar is door de plant. Voor vorming van nitraat is zuurstof nodig. Wanneer er meer nitraat in de bodem aanwezig is dan de plant kan opnemen ontstaat er een kans op uitspoeling. Denitrificerende bacteriën kunnen nitraat omzetten in stikstofgas (N_2) en het sterke broeikasgas lachgas (N_2O), dit gebeurt met name wanneer er een overschot aan nitraat in de bodem aanwezig is. Wanneer bacteriën nitraat omzetten naar N_2 is er geen zuurstof nodig. De gevormde N_2 gaat verloren in de lucht waardoor planten er geen gebruik meer van maken.

Bijlage 5 Correlatie nitrificerende bacteriën en pH



B 5. Correlatie tussen nitrificerende bacteriën en de pH.

Bijlage 6 *Penicillium*



B 6. Het totaal aandeel (%) van het genus *Penicillium* in de bodem.



Bioclear earth bv

Rozenburglaan 13
9727 DL Groningen
The Netherlands

T +31 (0)50 571 84 55

info@bioclearearth.nl
www.bioclearearth.nl