

Een vluchtig perspectief voor stimuleren van bodemweerbaarheid

Wietse de Boer^{1,2} &
Paolina Garbeva¹

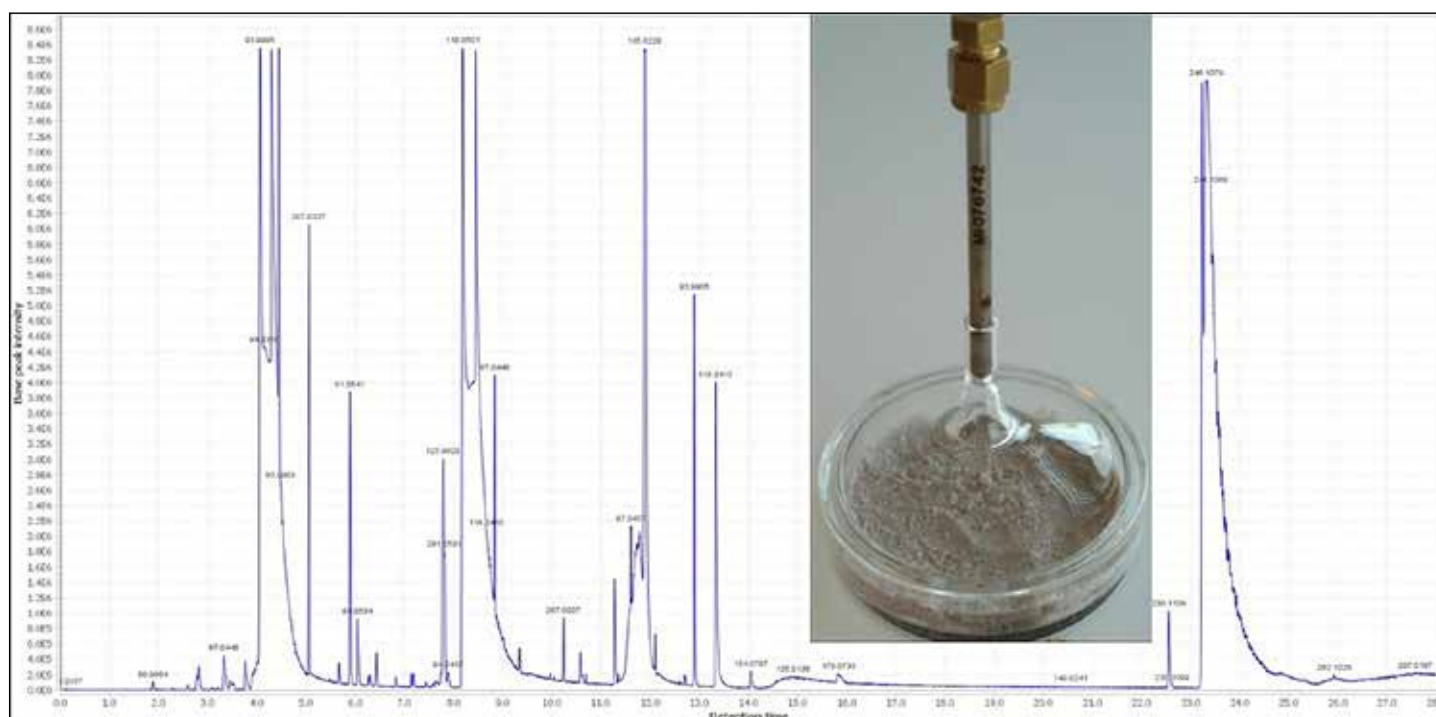
¹Dept. Microbial Ecology,
NIOO-KNAW, Wageningen
²Chairgroup Soil Biology,
Wageningen University,
Wageningen
w.deboer@nioo.knaw.nl

De geur van de bodem

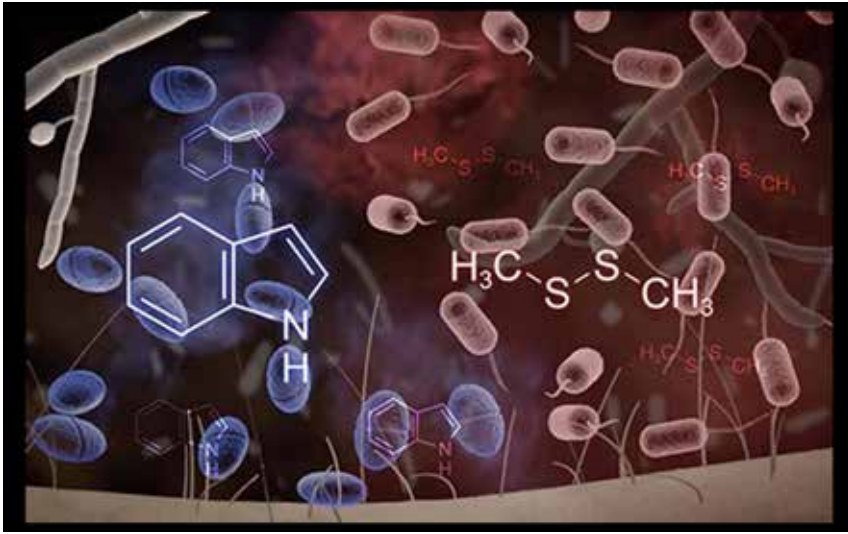
Iedereen zal de ervaring herkennen. Als het na een droge periode in de zomer gaat regenen komt er een muffige geur uit de bodem, de geur van de regen. Daar is zelfs een uit het Oudgrieks afgeleide term voor: "Petrichor". Het wordt veroorzaakt door vluchtige stoffen die door micro-organismen worden geproduceerd. Geosmine is de bekendste en de hoofdverantwoordelijken voor de productie daarvan zijn actinobacteriën, ook nog vaak actinomyceten genoemd. Als de droge bodem vochtiger wordt door de regen, raken de cellen van deze bacteriën actief en produceren geosmine. Ook een petrischaal waarop actinobacteriën groeien kan ruiken als een vochtige bodem. De genen op het bacteriële chromosoom die voor de productie verantwoordelijk zijn, zijn bekend maar waarom geosmine geproduceerd wordt is nog steeds onduidelijk. Algemeen wordt aangenomen dat het een signaalstof is, maar voor wie is het signaal bedoeld en wat wordt ermee gedaan?

Diversiteit van vluchtige stoffen in bodemlucht

Geosmine behoort tot de terpenen, een groep van onverzadigde koolwaterstof-verbindingen, waarvan er meer dan 30.000 bekend zijn en die vooral onderzocht zijn voor planten. De geur van planten, wordt in sterke mate bepaald door terpenen, zo is bijvoorbeeld alfa-pineen verantwoordelijk voor de geur van dennen en andere naaldbomen. Er is veel onderzoek gedaan naar de rol van terpenen voor de verdediging van planten tegen insectenvraat. Maar planten zijn niet de enige producenten van terpenen. Naast geosmine, worden door micro-organismen in de bodem een groot aantal verschillende terpenen geproduceerd¹. En het zijn niet alleen terpenen. Andere vluchtige stoffen die door micro-organismen worden geproduceerd vallen onder de alkanen, alcoholen, esters, pyrazines en organische zwavelverbindingen². De bodemlucht bevat dus een heel spectrum aan microbiële vluchtige stoffen. Gaschromatografische analyses van opgevangen vluchtige stoffen uit de bodem vertonen vaak 10-tallen pieken van vluchtige stoffen (Figuur 1). Na sterilisatie van de bodem verdwijnt dat, waarmee aangetoond wordt dat microben inderdaad verantwoordelijk zijn voor de productie.



Figuur 1: Analyse van vluchtige stoffen uit de bodem. Na absorptie (Tenax steel trap), volgt thermodesorptie en gaschromatografische analyse (GC-TOF/MS).



Figuur 2: Versterking van remming van schimmels door productie van verschillende vluchtige stoffen, zoals dimethyldisulfide en indool, door bacteriesoorten. Competitieve interactie tussen bacteriën kan deze productie stimuleren.

Functie van microbiële vluchtige stoffen in de bodem

In de meeste bodems is een deel van de poriën altijd of gedurende grote delen van het jaar gevuld met lucht. Vluchtige stoffen kunnen zich snel verspreiden door dit netwerk van met lucht-gevulde poriën. Dit vergroot de afstand waarop interacties tussen micro-organismen onderling of met plantenwortels kunnen plaats vinden. Micro-organismen komen heterogeen verspreid voor in bodems. De naaste burens kunnen zich, gerekend naar microbiële schaal, op grote afstand bevinden. Maar die burens kunnen wel concurrenten worden als er voedingsstoffen beschikbaar komen. De productie van groei-onderdrukkende vluchtige stoffen biedt een mogelijkheid om de reactie van de concurrent op beschikbaarheid van voedingsstoffen te stoppen of te vertragen. Veel bodemmicro-organismen lijken deze strategie van chemische oorlogsvoering via vluchtige stoffen te gebruiken. Ze produceren stoffen waar andere micro-organismen gevoelig voor zijn, maar worden zelf ook weer belaagd door stoffen die door concurrenten geproduceerd worden².

Bacteriën versus schimmels

Vluchtige stoffen lijken vooral een belangrijke rol te spelen in de bodem bij de concurrentie tussen bacteriën en schimmels (Figuur 2). Veel bodembacteriën die op een groeimedium gekweekt worden

produceren vluchtige stoffen die schimmels remmen, maar waar andere bacteriesoorten niet gevoelig voor zijn. Ook mengsels van verschillende bacteriesoorten blijken schimmelremmende vluchtige stoffen te produceren, en toename van bacterie-diversiteit lijkt de productie van schimmelremmende vluchtige stoffen zelfs te versterken³. Productie van schimmelremmende stoffen door hele gemeenschappen van bodembacteriën kon worden aangetoond op groeimedia met veel of weinig voedingsstoffen en ook in gesteriliseerde grond⁴.

De reden waarom bacteriën lijken samen te werken in hun strijd tegen schimmels zou een gezamenlijk belang kunnen zijn. Schimmels kunnen zich door hun draderige groeivorm (hyfen) door de bodem verplaatsen, terwijl de meeste bacteriën veel minder mobiel zijn. Een schimmel kan zich dus naar een voedingsbron, een plek met afbreekbare organische stof, toe bewegen. Bacteriën die het geluk hebben zich te bevinden op de plaats van zo'n voedingsbron zullen dat mogelijke proberen te voorkomen met de productie van schimmelremmende vluchtige stoffen.

En de schimmels, laten die zich zo maar wegdrücken door bacteriën? Nee, ook schimmels produceren vluchtige stoffen die effect op bacteriën kunnen hebben². Daarnaast is er nogal verschil in gevoeligheid tussen schimmelsoorten voor remmende vluchtige stoffen. Maar al met al, lijken bacteriën in de strijd met schimmels het meeste voordeel te halen uit de productie van vluchtige stoffen.

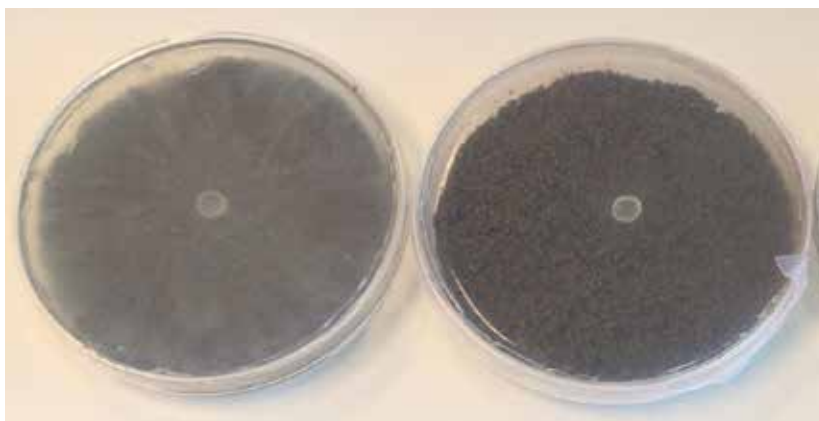
Schimmelremmende stoffen in de bodemlucht

De aanwezigheid van groeiremmende vluchtige stoffen in bodems kan eenvoudig worden aangetoond door schimmels of oömyceten te confronteren met lucht afkomstig uit een grondmonster en de groei te vergelijken met een controle, bijvoorbeeld gesteriliseerde grond (Figuur 3). Op deze manier kon de aanwezigheid van schimmel-onderdrukkende vluchtige stoffen in veel landbouwbodems worden aangetoond⁵. Uit dat en ander onderzoek kwam ook naar voren dat plantpathogene schimmels en -oömyceten vaak gevoeliger zijn voor remmende vluchtige stoffen dan saprotrofen (organische stof afbrekende schimmels)⁶. Verder werd ook duidelijk dat de mate van remming voor verschillende pathogene schimmels niet gelijk op hoeft te gaan. Zo gaven sommige bodemluchten een sterke remming van de groei voor *Fusarium* schimmels en weinig voor *Rhizoctonia*, terwijl het tegenovergestelde het geval was voor andere bodems⁵.

Vluchtige stoffen en ziekteonderdrukking

De gevoeligheid van pathogene schimmels voor verschillende microbiële vluchtige stoffen is al langer bekend. In de jaren 60-70 van de vorige eeuw is daar veel onderzoek aan gedaan en is al aangegeven dat stimuleren van de productie van deze stoffen in de bodem perspectief kan bieden voor biologische controle van bodem-gebonden schimmelziektes⁷. De aandacht voor dit onderzoek verminderde echter sterk door de focus op andere mechanismen van microbiële biocontrole, zoals productie van antibiotica en celwand-afbrekende enzymen, en de mogelijkheid om deze mechanismen met introductie van al dan niet gemodificeerd micro-organismen te versterken. Ondertussen is duidelijk dat dit vaak niet werkt omdat geïntroduceerde biocontrole microben worden weggeconcentreerd door de al aanwezige micro-organismen die zijn aangepast aan de lokale bodem omstandigheden⁸. Daarom richten veel onderzoeksgroepen zich (weer) op het stimuleren van gunstige micro-organismen in de bodem in plaats van ze te introduceren. Het stimuleren van de productie van pathogeen-onderdrukkende vluchtige stoffen door bodemmicroben is zo ook weer in de belangstelling komen te staan.

Veel van het onderzoek naar onderdrukking van pathogene bodemschimmels door vluchtige stoffen gaat over groeiremming (ook wel fungistase genoemd) en niet over ziekteonderdrukking⁹. Om het effect van vluchtige stoffen op ziekteonderdrukking te onderzoeken zijn testen met planten en pathogene schimmels nodig (bioassays) en het liefst onder omstandigheden die vergelijkbaar zijn met de praktijk. Aan dat soort testen schort het helaas nogal. Gelukkig zijn er wel een aantal voorbeelden



*Figuur 3: Groei van *Pythium intermedium* in agar aan de bovenkant van een Petri-schaal tijdens blootstelling aan vluchtige stoffen die diffunderen vanuit de onderkant die gesteriliseerde (links) of onbehandelde (rechts) landbouwgrond bevat.*

van onderzoek waarbij de onderdrukking van ziekte door microbiële productie van vluchtige stoffen in de bodem is gevonden. Zo hebben we in ons eigen onderzoek gevonden dat er een sterke relatie is tussen de mate van groeiremming van *Pythium* door bodemlucht en de onderdrukking van *Pythium* infectie van Hyacinth bollen in die bodem¹⁰.

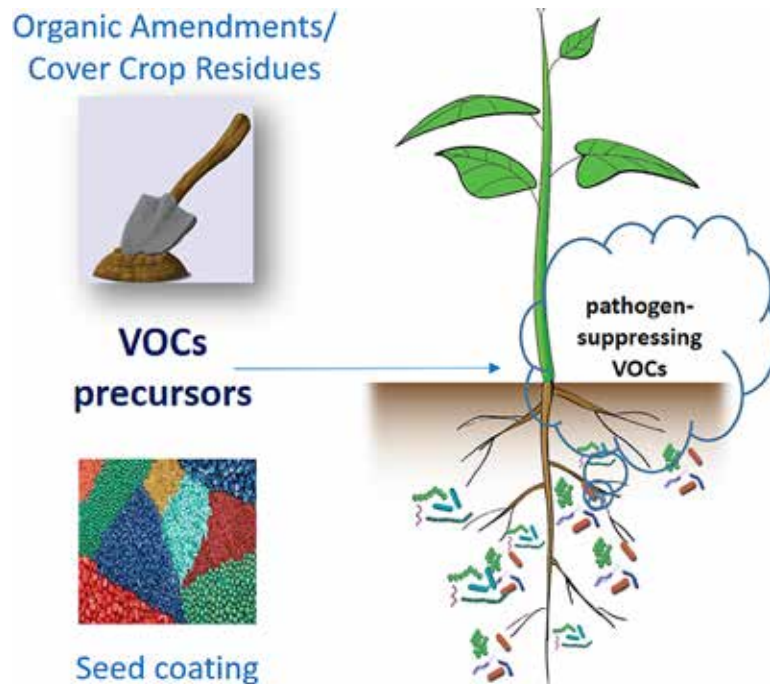
VolControl project

Binnenkort starten we met een door NWO-TTW gefinancierd project "VolControl" waarin zal worden onderzocht hoe de productie van pathogeen-onderdrukkende vluchtige stoffen door micro-organismen in de bodem kan worden gestimuleerd met toevoeging van organische materialen. De keuze van die materialen zal gebaseerd worden op de aanwezigheid van stoffen (precursors) waarvan bekend is dat ze leiden tot de productie van remmende vluchtige stoffen (Figuur 4). Effecten van bodemvochtgehalte, -dichtheid en -textuur zullen in het onderzoek worden meegenomen. Voor de ziekteonderdruggingstesten staan zowel kas- als veldproeven gepland. Deelnemende bedrijven zijn Bejo Zaden, Joordens Zaden en Bioclear Earth. Ook het Centrum voor Bodembioïologie (CSE, NIOO-WUR) is bij het project betrokken voor de vertaalslag naar de praktijk en media.

Stimulatie versus fumigatie

Afdoden van ziekte- en plaagorganismen in de bodem met behulp van vluchtige stoffen is op grote schaal toegepast met stoffen zoals methylbromide, meta-natrium en dichloorpropeen. De risico's voor de gezondheid bij inhaleren en de grote impact op het totale bodemleven hebben echter geleid tot een verbod op het gebruik van deze middelen. Zouden remmende vluchtige stoffen geproduceerd door bodem micro-organismen geschikt kunnen zijn voor een nieuwe generatie van bodemontsmettingsmiddelen? In feite is dit al gaande. Paladin[®], is een bodemfumigant geproduceerd door het Franse bedrijf Arkema en wordt gebruikt voor het afdoden van aaltjes en pathogene schimmels. De werkzame stof is dimethyldisulfide (DMDS). Vooralsnog is er geen toestemming gegeven om dit product in Europa te gebruiken.

DMDS kan door veel bodembacteriën worden geproduceerd gedurende de afbraak van zwavel-bevatende organische stoffen. Het is één van de stoffen die bijdragen aan de eerdergenoemde remming van pathogene schimmels door bodemlucht. Het is dus ook mogelijk om DMDS productie te stimuleren door zwavel-bevatende organische stoffen in te werken⁹. Hierbij kan gedacht worden aan het inwerken van



Figuur 4: Mogelijkheden om ziekte-remmende vluchtige stoffen te stimuleren worden onderzocht in het VolControl project.

zwavelrijk plantenmateriaal, zoals *Brassica* soorten. Het grote verschil met fumigatie is dat dit microbiële activiteit stimuleert en dat DMDS gedurende een langere periode geproduceerd wordt zonder dat dat heel hoge concentraties hoeft op te leveren. De verwachting is dat daarom onderdrukking van ziekte kan worden verkregen zonder een drastische ingreep voor het bodemleven.

Een vergelijking kan ook worden gemaakt met biologische grondontsmetting. De productie van toxische stoffen, waaronder ook vluchtige stoffen zoals isothiocyanaten, waarmee ziekteverwekkers worden afgedood vereist zuurstofarme condities. Daarom moet er na inwerken van de organische stoffen worden afgedekt met bijvoorbeeld folie. Hoewel het afdoden van ziekteverwekkers vaak goed werkt, heeft dit ook een enorme impact op het bodemleven zoals een drastische verandering van het bodemmicrobioom¹⁰. Hierdoor worden natuurlijk processen van ziekteonderdrukking uitgeschakeld. Dit maakt de bodem vatbaarder voor invasie door nieuwe pathogenen en het herstel kan enige maanden in beslag nemen¹⁰ (Figuur 5).

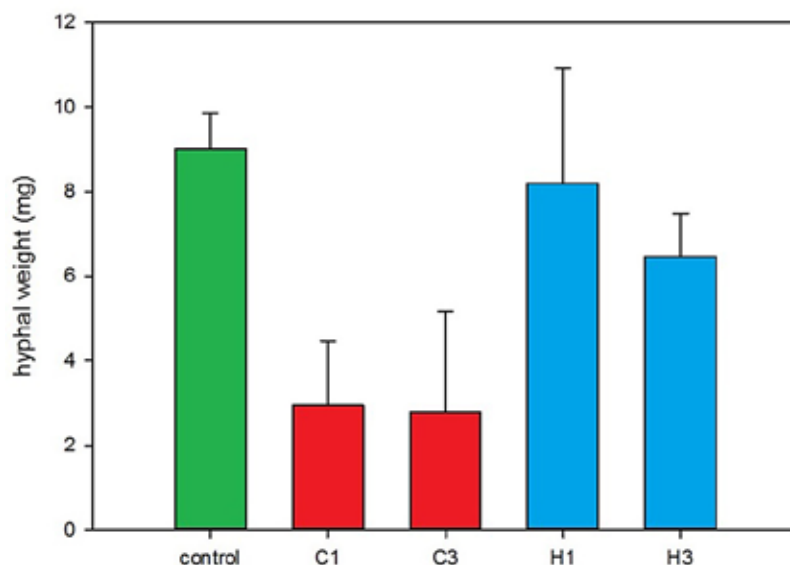
Het is maar de vraag of de hoge concentraties bij chemische fumigatie en de extreme omstandigheden bij biologische fumigatie wel nodig zijn om onderdrukking van bodemziektes door vluchtige stoffen te verkrijgen. Duidelijk is dat onderdrukkende werkingen van bacterieel geproduceerde vluchtige stoffen op pathogene schimmels kan plaats vinden

onder normale aerobe bodemomstandigheden en bij lage concentraties van vluchtige stoffen. Dat lijkt een goede basis om deze natuurlijke onderdrukking te optimaliseren, en dat is ook de basis voor het genoemde VolControl project.

De geur van gezonde bodem

De samenstelling van vluchtige stoffen in de bodem kan ook een aanwijzing geven over de chemische en biologische processen die in de bodem plaatsvinden en over de samenstelling van de micro-organismen die actief zijn in de bodem. De ontwikkeling van E-nose technologie, sensoren die de samenstelling van lucht bepalen, heeft een sterke ontwikkeling doorgemaakt voor medische toepassingen (bijvoorbeeld diagnose van ziektes via samenstelling uitgedemde lucht). Ook voor het meten van de samenstelling van bodemlucht is deze technologie verder ontwikkeld, met name om vervuilingen op te sporen. Aan inzet van deze technologie voor monitoring van microbiologische processen in de bodem of detecteren van aanwezige pathogenen wordt gewerkt, maar dit verloopt helaas nogal traag¹¹. Toch biedt dit zeker toekomstperspectief. Het is goed mogelijk dat bij deze ontwikkeling geomisine een rol krijgt als indicator voor de activiteit van actinobacteriën. Een indicator voor activiteit van actinobacteriën kan mogelijk ook een aanwijzing geven voor onderdrukking van pathogene bodemschimmels¹².

Figuur 5: Groei van *Pythium ultimum* (gewicht hyfen) blootgesteld aan vluchtige stoffen uit onbehandelde bodems (C1 en C2) en biologisch gedesinfecteerde bodems (H1 en H3), 3 maanden na de desinfectie behandeling. Controle is groei zonder aanwezigheid bodem. Voor details, zie (10).



Referenties

- Avalos, M. *et al.* (2021) Biosynthesis, evolution and ecology of microbial terpenoids. Adv. article: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/np/d1np00047k>
- Weisskopf, L. Schulz, S., Garbeva, P. (2021) Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature Rev. Microbiol.* 19,391- <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00508-1>
- Hol, W.H.G. *et al.* (2015) Non-random species loss in bacterial communities reduces antifungal volatile production. *Ecology* 96, 2042- <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00508-1>
- Li, X. *et al.* (2019) Volatile-mediated antagonism of soil bacterial communities against fungi. *Env. Microbiol.* 22, 1025- <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.14808>
- Van Agtmaal, M. *et al.* (2018) Volatile-mediated suppression of plant pathogens is related to soil properties and microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 117, 164- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071717306582>
- Garbeva, P., Weisskopf, L. (2020) Airborne medicine: bacterial volatiles and their influence on plant health. *New Phytol.* 226,32- <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/nph.16282>
- Stotzky, G., Schenk, S., Papavizas, G.C. (1976) Volatile organic compounds and microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 4, 333- <https://doi.org/10.3109/10408417609102303>
- Mazzola, M., Freilich, S. (2017) Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. *Phytopathology* 107, 256-<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW>
- De Boer, W. *et al.* (2019) Pathogen suppression by microbial volatile compounds in soils. *FEMS Microb. Ecol.* 95, f1z105 <https://doi.org/10.1093/femsec/f1z105>
- Van Agtmaal, M. *et al.* (2015) Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. *Front. Microbiol.* 6, 701 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00701/full>
- De Cesare, F. *et al.* (2011) Use of electronic nose technology to measure soil microbial activity through biogenic volatile organic compounds and gases release. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2094- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071711002380>
- Cordovez, V. *et al.*, (2015) Diversity and function of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from disease suppressing soil. *Front. Microbiol.* 6, 1081 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01081/full>