

**De ontwikkeling van een indicator voor  
het bodemleven en de bodemkwaliteit  
van akkergronden op basis van overige  
aaltjes.**



Foto: Roy Neilson, The James Hutton Institute.



# De ontwikkeling van een indicator voor het bodemleven en de bodemkwaliteit van akkergronden op basis van overige aaltjes.

*H. Keidel<sup>1</sup> en M. Zanen<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>BLGG AgroXpertus

<sup>2</sup>Louis Bolk Instituut

November 2013

Dit project maakt deel uit van het Actieplan Aaltjesbeheersing, een initiatief van het Hoofdproductschap Akkerbouw, Productschap Tuinbouw en LTO Nederland. Binnen het Actieplan voeren diverse partijen gezamenlijk onderzoeks- en voorlichtingsprojecten uit op het gebied van aaltjesbeheersing om de continuïteit van teelten voor de Nederlandse land- en tuinbouw te waarborgen.

Informatie over het Actieplan Aaltjesbeheersing:

**Productschap Akkerbouw**

Louis Braillelaan 80

2719 EK Zoetermeer

Postbus 908

2700 AX Zoetermeer

Telefoon: 079 - 368 7007

E-mail : [aaltjesbeheersing@hpa.agro.nl](mailto:aaltjesbeheersing@hpa.agro.nl)

Internet : [www.kennisakker.nl](http://www.kennisakker.nl)

**Dit rapport is een uitgave van BLGG AgroXpertus.**

Binnenhaven 5

Postbus 170

6700 AD Wageningen

Telefoon 088 - 876 101

E-mail: [klantenservice@blgg.agroxpertus.nl](mailto:klantenservice@blgg.agroxpertus.nl)

Internet: [www.blgg.agroxpertus.nl](http://www.blgg.agroxpertus.nl)

© 2013, Wageningen, BLGG AgroXpertus.

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

*Hoewel de inhoud van deze uitgave met zorg is samengesteld, kunnen hieraan op geen enkele wijze rechten worden ontleend.*

# INHOUDSOPGAVE.

	SAMENVATTING.	7
1.	INLEIDING.	9
1.1.	Duurzaam bodemgebruik en indicatoren.	9
1.2.	Aaltjes in het bodemvoedselweb.	11
1.3.	Doel van het project.	13
2.	MATERIAAL EN METHODEN.	15
2.1.	Inleiding.	15
2.2.	Monstername.	16
2.3.	Extractie van aaltjes uit de grond.	16
2.4.	Het selecteren van de aaltjes voor de indicator.	16
2.5.	Het vrijmaken van het DNA van de aaltjes voor de indicator.	17
2.6.	Het tellen en op naam brengen van de aaltjes voor de indicator.	17
2.7.	De betekenis van de indicator.	18
2.8.	De implementatie op het routine laboratorium.	18
2.9.	Kennisoverdracht	18
3.	RESULTATEN.	21
3.1.	Het selecteren van de aaltjes voor de indicator.	21
3.2.	Het vrijmaken van het DNA van de aaltjes voor de indicator.	23
3.3.	Het tellen en op naam brengen van de aaltjes voor de indicator.	24
3.4.	De betekenis van de indicator.	27
3.5.	De implementatie op het routine laboratorium.	33
3.6.	Kennisoverdracht.	36

4.	CONCLUSIES	37
5.	LITERATUUR.	41
Bijlage 1.	Fylogenetische verwantschapsboom nematoden.	45
Bijlage 2.	Toegepaste transformaties.	46
Bijlage 3.	Significante correlaties tussen het aantal Mononchida en Dorylaimida en de gemeten bodem-parameters.	47
Bijlage 4.	Roofaaltjes Expresse	48

## SAMENVATTING.

Enkele jaren geleden werd door de overheid de Transitie Duurzame Landbouw gestart. Een noodzakelijk onderdeel hiervan was een duurzamer bodemgebruik. Om vast te stellen of de doelen voor duurzamer bodemgebruik worden gehaald, kunnen indicatoren worden gebruikt. Op basis van de wetenschappelijke literatuur bleek dat aaltjes relevant zijn voor het bodemvoedselweb en de functionele biodiversiteit. Ook bleek dat aaltjes goede mogelijkheden bieden om als indicator te worden gebruikt.

Het doel van het project was om een methode te ontwikkelen die het mogelijk maakt om de aaltjesfauna te gebruiken als een toestandsindicator voor de bodem, en dan met name voor de functionele biodiversiteit als onderdeel van duurzamer bodemgebruik.

Om een zo goed mogelijk beeld van de bodem te krijgen, is het beste om aaltjes uit elk voedingsniveau uit het voedselweb te meten. Maar hierdoor werd de ontwikkeling van de indicator te omvangrijk en is besloten om één voedingsniveau volledig uit te werken. Op basis van de literatuur (onder andere Safni, 2002; Khan & Ho Kim, 2006) werd gekozen om dit te doen voor het vierde niveau (roofaaltjes). De groepen waarmee verder werd gegaan, waren verdeeld over twee ordes: Mononchida en Dorylaimida.

Om de indicator te kunnen gebruiken moet deze op de een of andere manier iets zeggen over het bodemleven (biodiversiteit) en bodemkwaliteit. Binnen het project werd gepoogd om deze kennis te verzamelen uit afgeronde projecten waarin de aaltjesfauna was onderzocht. De werkzaamheden werden uitgevoerd in nauwe samenwerking met het Louis Bolk Instituut in Driebergen. Er werd gebruik gemaakt van een selectie van de momenteel beschikbare data op het Louis Bolk Instituut, afdeling Bodem & Plant. In de meeste monsters domineerden aaltjes uit de orde Dorylaimida. Op zandgronden varieerde het aantal Dorylaimida van 0 tot 451. Het aantal Mononchida op zandgronden lag tussen 0 en 220 per 100 g verse grond. De aantallen Dorylaimida en Mononchida lagen op de kleigronden duidelijk lager, respectievelijk tussen 0 en 111, en tussen 0 tot 85 per 100 g verse grond. Voor lössgronden was dit voor Dorylaimida 0 tot 209 en voor Mononchida 0 tot 70. Het

gemiddelde aantal Dorylaimida en Mononchida per grondsoort werd gebruikt als referentiewaarde waarmee de uitslag van een willekeurig grondmonster kan worden vergeleken .met de referentie, waarbij de mate van afwijking gebruikt wordt bij de beoordeling. Grafisch werd dit in een amoebe-diagram (radargrafiek) zichtbaar gemaakt. Om een betekenis aan de indicator te kunnen geven, werden een groot aantal correlaties onderzocht. In zandgrond waren bij Dorylaimida *Dorylaimoidea* en *Aporcelaimellus* de belangrijkste groepen. Bij Mononchida waren dit *Clarkus* en *Mylonchulus*. Voor de kleigronden lag dit iets complexer en droegen meer taxa bij aan de totalen. Een aantal correlaties waren vanuit landbouwkundig oogpunt interessant. Naarmate zandgrond een hoger gehalte aan organische stof heeft, werden meer Dorylaimida gevonden. Bij kleigronden was dit niet zo. Mogelijk dat zandgronden met meer organische stof beter vocht vasthielden. Dit is gunstig voor aaltjes. Voor kleigronden was dit minder van belang omdat deze van nature vochtiger zijn. Dorylaimida hadden een positief effect op de potentiële stikstofmineralisatie en de potentiële mineraliseerbare N (PMN). Dorylaimida hadden in de zandgronden een gunstig effect op de stikstofmineralisatie. Voor de kleigronden lag dit anders. Alleen Mononchida bleken een gunstig effect te hebben op de stikstofmineralisatie (PMN). Voor Dorylaimida werd een negatief effect gevonden op de potentiële N mineralisatie. Opvallend was op zandgrond de negatieve correlatie van Dorylaimida met HWC (Hot Water-extractable Carbon).

Er werd veel tijd besteed aan de implementatie en kwaliteitscontrole van de DNA-testen. Uit eerdere ervaringen bleek namelijk dat het overzetten van DNA-testen uit laboratoriumomstandigheden naar routineomstandigheden niet zo eenvoudig was.

Tijdens de bijeenkomsten van de Begeleidingscommissie Onderzoek van het Aaltjesactieplan in 2012 werden korte power-pointpresentatie gegeven over de voortgang van het project. Dit werd ook gedaan tijdens de Landelijke buitendienstdag van BLGG AgroXpertus. Er werd door BLGG AgroXpertus een speciale Expresse aan roofaaltjes gewijd.



# 1. INLEIDING.

## 1.1 Duurzaam bodemgebruik en indicatoren.

De landbouw is de afgelopen decennia sterk veranderd. Door de intensivering van het landgebruik ontstaan er steeds meer vragen over hoe duurzaam dit is. De wijze waarop de bodem wordt gebruikt, wordt vooral bepaald door de bedrijfsvoering van de teler. De bedrijfsvoering wordt op zijn beurt beïnvloed door de markt. Enkele jaren geleden is door de overheid de Transitie Duurzame Landbouw gestart. Een noodzakelijk onderdeel hiervan is te komen tot een duurzamer bodemgebruik. Maar wat is een duurzamer bodemgebruik? De TCB (2005) definieert duurzaam bodemgebruik vanuit het perspectief van bodembescherming en noemt 4 aandachtsvelden:

1. Het voorkomen van negatieve gevolgen van het gebruik elders en later.
2. Het in stand houden van het bodemgebruik op de lange termijn.
3. Het rekening houden met de opvolgbaarheid van andere vormen van bodemgebruik.
4. Het onderhouden van ecologische functies die van algemeen belang zijn.

Om hieraan handen en voeten te geven heeft de TCB bodemkwaliteitsparameters vastgesteld:

- Organische stof;
- Nutriënten;
- Overige stoffen;
- Functionele biodiversiteit;
- Fysische bodemkwaliteit.

Op basis van hun definitie stelt de TCB dat verschillende vormen van bodemgebruik in de landbouw niet duurzaam zijn omdat deze vormen schade aanrichten aan de bovengrond. Hierdoor ontstaan er negatieve effecten op één of meerdere aandachtsvelden. Om het bodemgebruik in de landbouw duurzamer te maken, moet het dus anders. De TCB heeft hiervoor een aantal doelen per bodemkwaliteitsparameter afgeleid:

- Voor organische stof een minimum niveau in de bovengrond, afhankelijk van in ieder geval het bodemtype;
- Lekverliezen van nutriënten tot een minimum terug te brengen;
- Voor overige stoffen (metalen, geneesmiddelen, bestrijdingsmiddelen) streven naar *stand still*;
- Functionele biodiversiteiten behouden of versterken;
- Fysische bodemkwaliteit: bodemdaling, erosie, verslemping verminderen en/of stopzetten.

Om vast te stellen of de doelen voor duurzamer bodemgebruik worden gehaald, kunnen indicatoren worden gebruikt. Deze bepalen in welke richting het bodemgebruik zich ontwikkeld. Er wordt onderscheid gemaakt tussen toestandsindicatoren en gebruikersindicatoren (TCB, 2005). Gebruikersindicatoren geven aan in hoeverre het bodemgebruik de doelen voor duurzamer bodemgebruik worden gehaald. Toestandsindicatoren zeggen iets over de gezondheid van de bodem zelf. Idealiter is om over een 'bodemthermometer' te beschikken om de gezondheid van de bodem te beoordelen, vergelijkbaar met een koortsthermometer bij de mens. Helaas is dit nog toekomst. Wel wordt er geëxperimenteerd met een verzameling bodemparameters die bekend staat onder de naam BoBi (Bodembologische indicator). Er is nog weinig ervaring met de toepassing hiervan in praktijksituaties. Hierdoor zijn er nog geen voldoende onafhankelijke referenties waaraan getoetst kan worden. Dit probleem wordt vaak opgelost door de waarde van de indicatoren uit te drukken ten opzichte van een referentiesituatie. Nadeel hiervan is dat de keuze van de referentie vaak tot discussie leidt, omdat deze keuze sterk normerend is.

Er zijn een aantal eisen die aan een indicator worden gesteld:

1. De indicator moet op de een of andere manier iets zeggen over datgene waarvoor ze als indicator wordt gebruikt (relevantie).
2. Er moet inzicht zijn in de manier waarop de waarde van de indicator te beïnvloeden is (stuurbaarheid).
3. Aan de waarde van de indicator moet een betekenis gehecht kunnen worden (goed, slecht, veel, weinig) of deze moet grens- en/of drempelwaarden kunnen opleveren (normering).

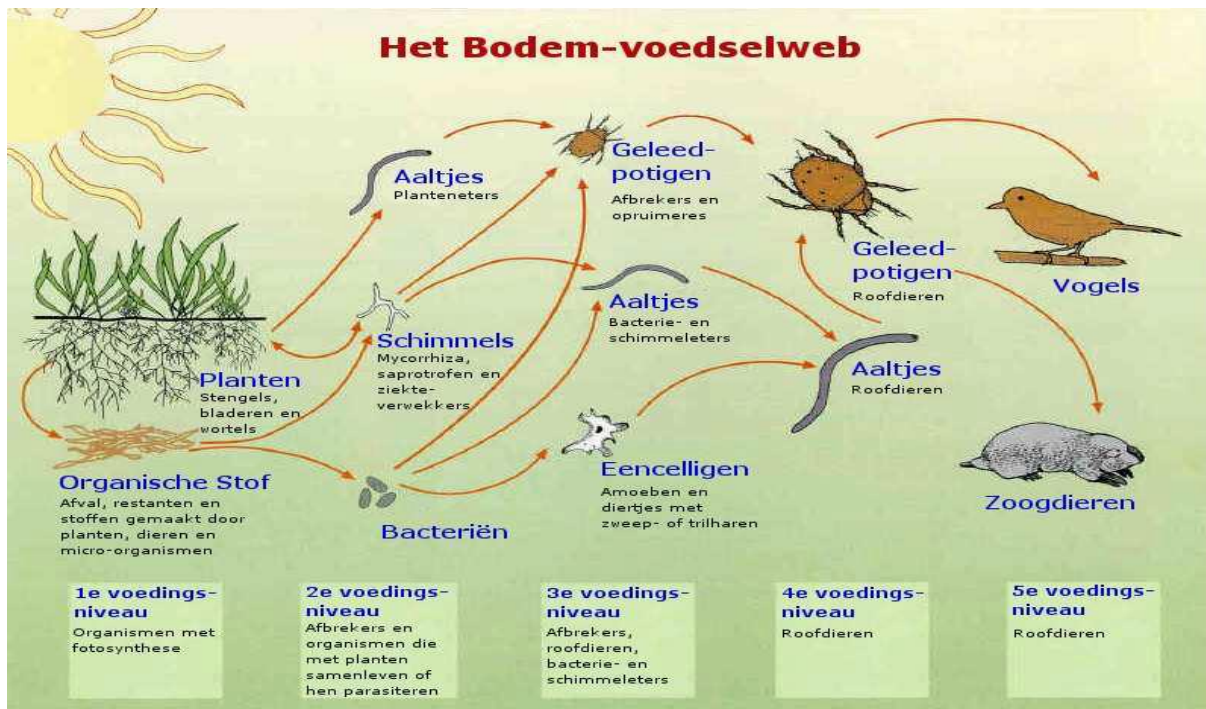
4. De indicator moet technisch goed te onderzoeken zijn. Dit betekent dat bijvoorbeeld monsternamen en analyse goed en betrouwbaar uitvoerbaar moeten zijn (kwantificeerbaarheid).
5. Het onderzoek moet financieel aantrekkelijk zijn. Voor projectmatig onderzoek is dit anders dan voor onderzoek in de praktijk.

De afgelopen decennia is er door verschillende onderzoekers aangegeven dat aaltjes een belangrijke rol in het bodemvoedselweb hebben en kansen bieden als indicator (zie ook box 1). Aaltjes spelen een rol bij:

- Het vrijmaken van nutriënten doordat ze bacteriën en schimmels eten en ammonium uitscheiden omdat bacteriën en schimmels veel meer stikstof bevatten dan aaltjes nodig hebben (Ferris et al., 1998). Volgens Beare (1997) is de totale bijdrage van bacterie-etende aaltjes en roofaaltjes aan de stikstofmineralisatie 8-19%.
- Het stimuleren van bacterie- en schimmelgroei door deze te begrazen. De populaties blijven hierdoor jong en actief. Roofaaltjes op hun beurt voeden zich met bacterie-etende en schimmel-etende aaltjes en reguleren zo hun populaties (Wardle & Yeates, 1993).
- Het verspreiden van bacteriën, schimmels en andere organismen.
- Als voedselbron voor andere organismen zoals roofaaltjes, micro-arthropoden en bodeminsecten.
- De bodemgezondheid doordat ze schadelijke organismen eten, waaronder plantenparasieten (Bilgrami & Brey, 2005; Khan & Ho Kim, 2006).

## 1.2. Aaltjes in het bodemvoedselweb.

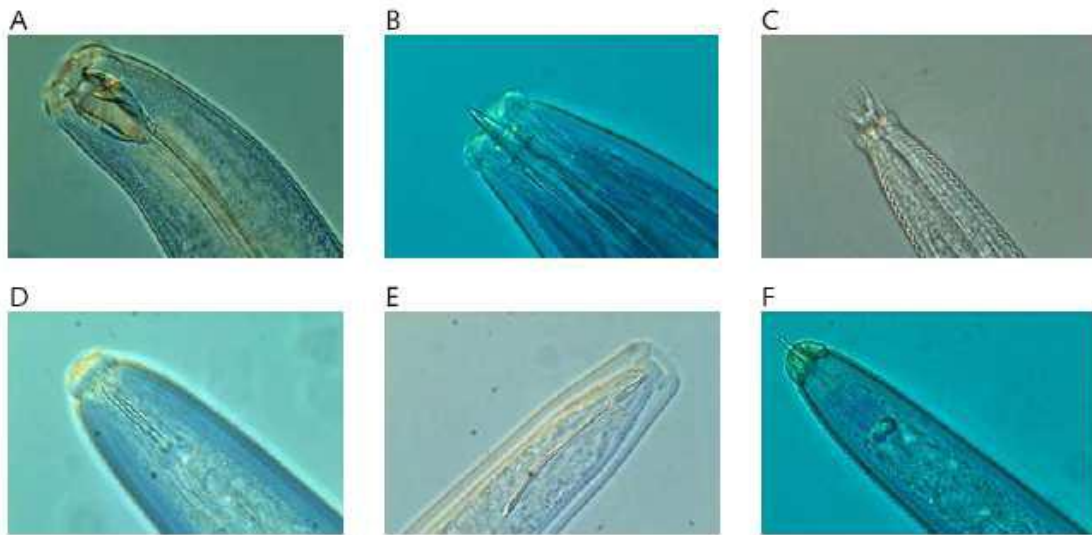
Aaltjes zijn kleine draadvormige wormen van circa 0,5-5 mm lang. Ze worden ook wel nematoden of rondwormen genoemd. Ze zijn niet gesegmenteerd, zoals regenwormen. Het aantal soorten is wereldwijd waarschijnlijk enkele honderdduizenden. Aaltjes zijn vooral bekend uit de land- en tuinbouw door de grote schade die ze geven aan gewassen. Gelukkig zijn dit maar een beperkt aantal soorten. Vanuit het landbouwkundige onderzoek zijn er goede en betrouwbare methoden voorhanden om aaltjes te onderzoeken.



**Figuur 1.** Het bodemvoedselweb. Aaltjes komen op de meeste niveaus voor.

Het grootste deel van de aaltjes vervult een belangrijke rol in het bodemsysteem doordat ze op de verschillende plaatsen in het voedselweb voorkomen (figuur 1). Juist door deze rol in het bodemvoedselweb en het feit dat ze relatief makkelijk te onderzoeken zijn, is de belangstelling voor aaltjes om ze te gebruiken bij één of andere wijze van bodembeoordeling, sterk gegroeid. Zo worden aaltjes vaak als veldparameter gebruikt bij het zogenaamde TRIADE-onderzoek. Dit wordt uitgevoerd om risico's van verontreinigingen in beeld te brengen (Mesman et al., 2008).

In een grondmonster komen normaal per 100 ml grond ongeveer 3.000–8.000 aaltjes voor. Zij vormen samen de aaltjesfauna. Deze bestaat uit tientallen soorten en is op te delen in het voedsel dat de aaltjes eten: planten, algen en mossen, bacteriën, schimmels, andere organismen (waaronder aaltjes), en alleseters (figuur 2; Yeates et al., 1993). Dit worden ook wel de trofische groepen genoemd. De plantenetters kunnen opgedeeld worden in soorten die van economisch belang zijn, zoals *Meloidogyne* (wortelknobbelaaltjes) en *Pratylenchus* (wortellesieaaltjes), en soorten waarvan bekend is dat ze geen economische schade geven, zoals Tylenchidae. Het landbouwkundig aaltjesonderzoek richt zich op de soorten die van economisch belang zijn.



**Figuur 2.** De vorm van de mondholte bepaalt het voedsel van aaltjes en daarmee de plaats in het bodemvoedselweb (figuur 1). Foto's: Wageningen UR. A. Roofaaltje met grote mondholte en tand voor het vangen van prooien (voedselniveau 4). B. Roofaaltje met speer voor het aanprikken van prooien, bijvoorbeeld aaltjes voedselniveau 4). C. Bacterie-eter met kopaanhangsels voor het vangen van bacteriën (voedselniveau 3). D. Schimmeleter met speer voor het aanprikken van schimmeldraden (voedselniveau 3). E. Planteneter met speer voor het aanprikken van plantenwortels (voedselniveau 2). F. Planteneter met stekel voor het aanprikken van plantenwortels (voedselniveau 2).

### 1.3. Doel van het project.

Het doel van het project is om een methode te ontwikkelen die het mogelijk maakt om de aaltjesfauna te gebruiken als een toestandsindicator voor de bodem, en dan met name voor de functionele biodiversiteit als onderdeel van duurzamer bodemgebruik. Hierbij is vooral aandacht besteed aan:

1. Ontwikkelen van een methode om de aaltjesfauna te meten, waarbij de methode voldoende robuust en betaalbaar is.
2. De betekenis van de indicator en de aanzet tot een normering.

**Box 1. Nematoden als indicator.**

Halverwege de jaren zeventig van de vorige eeuw werden nematoden al gebruikt in mariene systemen als indicator voor de kwaliteit van slib (Tietjen, 1977). In de jaren hierna is dit overgewaaid naar terrestrische bodems. De Nederlandse onderzoeker Bongers heeft hierbij met zijn boek 'De nematoden van Nederland' (Bongers, 1988) en de ontwikkeling van de 'Maturity Index' (Bongers, 1990) een grote rol gespeeld. Nadat Blgg in 1992 startte met het aanbieden van bodemanalyses op alle nematoden, kwam dit onderzoek ook ter beschikking aan anderen. Dit resulteerde onder andere in de opname van nematoden in BoBi. Ruim 50 jaar wordt er in de (landbouw)praktijk onderzoek naar nematoden gedaan. Hierdoor is er veel kennis en ervaring aanwezig over de monsternamen en analyse en kunnen deze goed en betrouwbaar worden uitgevoerd. Dit komt vooral omdat nematoden makkelijk te bemonsteren zijn. Ook de extractie en analyse is eenvoudig, waardoor de kosten relatief laag zijn. Een veelbelovende ontwikkeling is om de analyse uit te voeren met PCR-DNA. BLGG AgroXpertus heeft de beschikking over PCR-DNA methoden om nematoden te kwantificeren. Hierdoor komt een efficiënte ontwikkeling van een indicator voor bodemleven en bodemkwaliteit, die ook voor de teler betaalbaar is, binnen handbereik. Een bijkomend voordeel is dat de analyse in het zelfde extract kan waarin de schadelijke aaltjes worden geanalyseerd. Voor deze laatste zijn al moleculaire testen ontwikkeld. Welke trofische groepen in een bodem aanwezig zijn en hoe hun onderlinge verhoudingen zijn, wordt voor een belangrijk deel bepaald door grondeigenschappen (grondsoort, zuurgraad, bemestingstoestand, vochtgehalte) en het grondgebruik (gewas, bemesting, bestrijdingsmaatregelen). Hierdoor kunnen op het oog gelijke bodems een andere opbouw van de trofische groepen hebben. Beide gronden worden gedomineerd door bacterie-etters, maar verschillen opmerkelijk in het aandeel schimmeleeters en carnivoren; het aandeel planteters is in beide monsters nagenoeg gelijk. Uit een ander onderzoek in de aardbeiteelt (Zanen et al., 2010), bleek ook dat het aantal carnivore en omnivore nematoden op de percelen zonder problemen hoger lag dan op de probleempercelen. Ook de verhouding tussen bacterie- en schimmeleeters wordt in de literatuur een indicator genoemd die iets zou zeggen over de bodemkwaliteit (Bongers & Bongers, 1998; Freckman & Ettema, 1993; Ugarte & Zaborski, 2009).



Verdeling van de functionele groepen voor twee verschillende akkerpraktijkgronden.

## 2. MATERIAAL EN METHODEN.

### 2.1. Inleiding.

In de laatste twee decennia van de vorige eeuw startte bij de WUR (Universiteit en PRI) de ontwikkelingen om aaltjes via hun erfelijk materiaal (DNA) op naam te brengen. In het begin van deze eeuw kwam dit door betere technieken in een stroomversnelling. Aan de basis van deze ontwikkelingen lagen twee grote projecten: 'The Maturity Index inside out' (STW project 04725) en 'Lux in Terra' (SenterNovem project IS043076). De WUR trad bij beide projecten op als projectleider. BLGG was bij het eerste project lid van de Gebruikersgroep en bij het tweede project deelnemer. Binnen deze projecten werden van veel Nederlandse aaltjes DNA-sequenties gemaakt, met de nadruk op de schadelijke soorten. Uniek was dat, naast de informatie over het DNA, van de nematoden foto's werden opgeslagen om zo een verbinding te maken tussen microscopisch en moleculair onderzoek. Ook werd de extractiemethode om DNA uit nematoden te krijgen, verbeterd. De resultaten van beide projecten werden door de WUR vooral gebruikt voor fylogenetisch onderzoek (Holterman et al., 2006). BLGG gebruikte de kennis voor het ontwikkelen van routine-analyses waarbij schadelijke aaltjes via hun DNA worden geteld. Het lag voor de hand om voor de ontwikkeling van de indicator aan te sluiten bij de genoemde ontwikkelingen. Ook de ervaringen van de afgelopen 20 jaren die bij BLGG zijn opgedaan met het onderzoek van milieuaaltjes, werd gebruikt.

In het traject van de ontwikkeling van de indicator werden 7 stappen onderscheiden:

1. De monstername.
2. Extractie van de aaltjes uit de grond.
3. Het vaststellen van de doelaaltjes.
4. Het vrijmaken van het DNA uit de aaltjes.
5. Het tellen en op naam brengen van de aaltjes met hun DNA.
6. De betekenis van de indicator.
7. De implementatie op het routine laboratorium.

## **2.2. Monstername.**

Uit de ervaringen met het onderzoek op milieuaaltjes bleek dat de manier waarop in de akkerbouw vrijlevende aaltjesmonsters worden genomen (een verzamelmonster uit circa 60 steken met een gutsboor op bouwvoordiepte), goed bruikbaar was om de totale aaltjesfauna (alle schadelijke en niet schadelijke aaltjes) in kaart te brengen. Het was dus niet nodig om binnen het project aan de monstername aandacht te schenken.

## **2.3. Extractie van aaltjes uit de grond.**

Om aaltjes te kunnen tellen, is het nodig om ze uit de grond te halen (extraheren). Voor de vrijlevende aaltjes wordt in Nederland de Oostenbrinktrechter gebruikt, gevolgd door de wattenmethode (s' Jacobs en Van Bezooijen, 1986). Behalve schadelijke aaltjes, worden ook de andere aaltjes uit de grond gehaald, zoals bleek uit de ervaringen met het onderzoek van milieuaaltjes. Binnen het project werd hieraan geen onderzoek verricht.

## **2.4. Het selecteren van de aaltjes voor de indicator.**

Om een zo goed mogelijk beeld van de bodem te krijgen, is het beste om aaltjes uit elk voedingsniveau (zie figuur 1) te gemeten. Maar hierdoor werd de ontwikkeling van de indicator te omvangrijk om binnen de tijd en het budget van het project uit te voeren. Daarom werd besloten om één voedingsniveau volledig uit te werken tot een bruikbare indicator. Op basis van de literatuur (onder andere Safni, 2002; Khan & Ho Kim, 2006) werd gekozen om dit te doen voor het vierde niveau (roofaaltjes). De belangrijkste redenen hiervoor waren dat deze groep relatief gelijkvormig is, een belangrijk onderdeel uitmaakt van het bodemvoedselweb, en ook schadelijke aaltjes eet. Binnen het project werd onderzocht welke aaltjes uit het vierde niveau in de Nederlandse akkers voorkomen omdat dit de potentiële kandidaten voor de indicator waren. Hiervoor werden de oude onderzoeken bij BLGG op milieuaaltjes geanalyseerd op de aanwezige roofaaltjes. Vervolgens werd onderzocht of er van de geselecteerde roofaaltjes informatie bestond over hun DNA-profielen. Roofaaltjes werden gedefinieerd als de aaltjes waarvan bekend was dat ze carnivoor of omnivoor zijn. De indeling van Yeates et al (1993) werd gevolgd.



### **2.5. Het vrijmaken van het DNA van de aaltjes voor de indicator.**

Om aaltjes via hun DNA te kunnen meten, is het nodig dat het DNA vrij komt uit de aaltjes. Hiervoor moet de huid van de aaltjes (cuticula) kapot worden gemaakt. De gangbare methode is een combinatie van mechanische beschadigen en lyse (kapotmaken van celmembranen). Binnen het project werd onderzocht of deze methode ook toepasbaar was op de geselecteerde aaltjes.

### **2.6. Het tellen en op naam brengen van de aaltjes voor de indicator.**

Als het DNA van de aaltjes vrij is gemaakt, is het nodig om dit DNA te meten en te herkennen. Hiervoor wordt niet het hele DNA gebruikt, maar slechts een bepaald stukje dat kenmerkend is voor het aaltje. Omdat van het doel-DNA vaak maar weinig aanwezig is, wordt dit eerst vermeerderd via PCR (Polymerase Chain Reaction). Van het bepaalde stukje DNA worden kopieën gemaakt totdat er genoeg van is om goed het te meten. PCR gebeurt in een speciaal apparaat, de thermocycler. Om dit kopiëren te kunnen starten, zijn primers nodig. Dit zijn specifieke stukjes DNA die corresponderen met de verschillende aaltjessoorten (elk aaltjessoort heeft zijn eigen primer). Door de primers van gezochte aaltjes bij de DNA-oplossing van een grondmonster te doen, wordt alleen het DNA van deze aaltjes vermenigvuldigd en gemeten. De aaltjes moeten dan wel in het grondmonster aanwezig zijn geweest. Alleen de aaltjes waarvan primers worden toegevoegd, kunnen gemeten worden. Verder is het noodzakelijk dat de primers uniek zijn voor de gezochte aaltjes, en niet reageren met het DNA van andere aaltjes of bijvoorbeeld schimmels. Binnen het project werden in samenwerking met de WUR de primers ontwikkeld, verbeterd en getest. Hiervoor werden de gangbare protocollen gebruikt.

Voor een goed advies is het noodzakelijk om de aantallen aaltjes te weten. Dit wordt gedaan met kwantitatieve PCR. Hierbij wordt het absolute aantal kopieën van een bepaalde stukje DNA (dat uniek is voor een aaltjessoort) door het resultaat van de reactie te vergelijken met een ijklijn (beter: kalibratielijn). Een kalibratielijn is een reeks metingen van standaardoplossingen met een bekende concentratie DNA. Door een gemeten hoeveelheid DNA uit een grondmonster op zo'n kalibratielijn te zetten, kan afgelezen worden met hoeveel aaltjes dit ongeveer overeenkomt. Binnen het project werden in samenwerking met de WUR de kalibratielijnen ontwikkeld.

## **2.7. De betekenis van de indicator.**

Om de indicator te kunnen gebruiken moet deze op de een of andere manier iets zeggen over het bodemleven (biodiversiteit) en bodemkwaliteit. Het mooiste is als er aan de getalswaarde van de indicator een betekenis gehecht kan worden (goed, slecht, veel, weinig) of grensen/of drempelwaarden (normering). Daarnaast is het wenselijk dat bekend is hoe de waarde van de indicator te beïnvloeden is (stuurbaarheid). Het is nodig om kennis te hebben over abundantie van de aaltjes binnen de indicator, de factoren die hierop van invloed zijn, en wat hun rol is in de bodem. Binnen het project werd gepoogd om deze kennis te verzamelen uit afgeronde projecten waarin de aaltjesfauna was onderzocht. De werkzaamheden werden uitgevoerd in nauwe samenwerking met het Louis Bolk Instituut in Driebergen. Er werd gebruik gemaakt van een selectie van de momenteel beschikbare data op het Louis Bolk Instituut, afdeling Bodem & Plant. Er werd alleen data gebruikt afkomstig uit de akkerbouw en vollegronds groententeelt. De data was afkomstig van monsters genomen tussen augustus 2005 en april 2012. In totaal bestond de dataset uit 216 individuele grondmonsters, waarvan er 127 op zand, 78 op klei en 11 op löss waren genomen. Van ieder monster werden maximaal 57 variabelen meegenomen in de analyse, 4 bodemfysische, 8 bodemchemische en 45 bodembioologische, en getest op normaliteit van de verdeling. Voor een aantal van de variabelen bleek een logaritmische transformatie nodig (bijlage 2). De onderlinge correlaties werden berekend middels een Spearman (rangorde) correlatie toets. Correlaties met P-waarden onder de 0,05 werden aangemerkt als significant.

## **2.8 De implementatie op het routine laboratorium.**

Een deel van de technische ontwikkelingen zijn op de Wageningen Universiteit uitgevoerd. Voor routineanalyses was het nodig om dit over te brengen naar het laboratorium Bodemgezondheid van BLGG AgroXpertus in Wageningen. Binnen het project werd dit gerealiseerd en werd de methodiek gevalideerd door intern te testen volgens protocollen van de Raad van Accreditatie (RvA) en praktijkmonsters uit akkerbouwgronden, waarvan de DNA-extracten waren bewaard.

## **2.9 Kennisoverdracht**

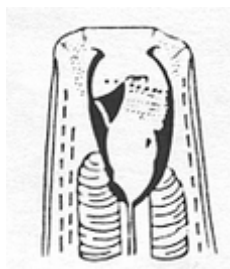
Binnen de looptijd van het project is aandacht geweest voor kennisoverdracht.

**Box 2. Taxonomie van nematoden.**

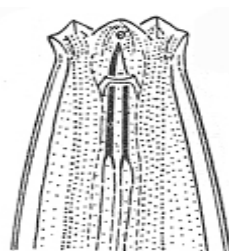
Zoals alle levende organismen zijn ook de nematoden ingedeeld in groepen. Vooral in de vorige eeuw is hieraan veel werk verricht. Nederland heeft hierin altijd een vooraanstaande rol gespeeld. Deze indeling is vrijwel uitsluitend gedaan op basis van uiterlijke (morfologische) kenmerken. Het basisoniveau is de soort of specie, een dubbele naam die bestaat uit de geslachtsnaam (genus) en een specifieke soortnaam. Deze laatste zegt vaak iets over de nematode, bijvoorbeeld de plaats waar die is gevonden of een opvallend kenmerk; soms wordt de naam van een belangrijke nematoloog gebruikt (*Meloidogyne chitwoodi* is genoemd naar Chitwood, een bekend Amerikaanse nematoloog). Voorbeelden van soorten zijn *Mononchus aquaticus* en *Clarkus papillatus*. Het is gebruikelijk om de soortnaam cursief te schrijven. Het volgende niveau is het geslacht of genus. Dit bestaat uit soorten die een groot aantal gemeenschappelijke kenmerken hebben. Voorbeeld zijn *Mononchus* en *Clarkus*. Ook de geslachtsnaam wordt cursief geschreven. Geslachten met een aantal gemeenschappelijke kenmerken worden samengevoegd in een familie. Voorbeeld is Mononchidae, waaronder de geslachten *Mononchus* en *Clarkus* vallen. Een familienaam wordt niet cursief geschreven en eindigt op 'dae'. Families zijn uiteindelijk ondergebracht in een aantal orden. Tussen de genoemde niveaus kunnen allerlei subniveaus voorkomen, zoals superfamilie (tussen familie en orde) of subfamilie (tussen geslacht en familie). De bovengenoemde indeling is gebaseerd op morfologische kenmerken, dus in hoeverre nematoden uiterlijk op elkaar lijken. De laatste jaren worden er ook indelingen gemaakt op basis van het erfelijke materiaal (DNA) van nematoden. De indeling is dan niet gebaseerd op hun uiterlijke gelijkenis, maar op hun verwantschap in DNA. Op deze manier is het mogelijk om verwantschapbomen te maken (Holterman et al, 2006). De DNA-profielen van de nematoden die hiervoor gebruikt zijn, zijn ook geschikt voor routine analyses, en zijn opgeslagen in een databank. Worden de beide indelingen naast elkaar gelegd, dan blijken deze niet al te veel van elkaar te verschillen.

*Indeling roofaaltjes.*

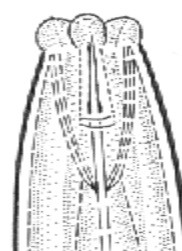
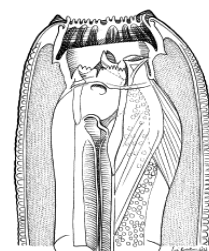
De meest opvallende groep zijn de Mononchida. De soorten die hieronder vallen zijn echte carnivoren en worden gekenmerkt door één of meerdere tanden in de mondholte. Ze zijn hiermee ook onder de microscoop makkelijk te herkennen. Met deze tanden worden prooien opengereten. Van sommige Mononchida-soorten is bekend dat ze schadelijke aaltjes eten. De Dorylaimida zijn de meest algemene groep. De soorten die hiertoe worden gerekend hebben een speer, die wel wat lijkt op de stekel bij schadelijke aaltjes. Hiermee prikken ze hun prooi aan en zuigen deze leeg. De Dorylaimida is een zeer diverse groep die bestaat uit carnivoren en omnivoren die lastig onder de microscoop te onderscheiden zijn. Omdat Dorylaimida hun prooi niet opslokken maar leegzuigen, kunnen ze prooien aan die groter dan henzelf zijn. Binnen de Dorylaimida komen ook planteneters en schimmeleeters voor. Naast deze twee grote groepen zijn er nog twee andere groepen met roofaaltjes: de Aphelenchida, waarin het geslacht *Seinura* bekend staat als carnivoor, en de Diplogasterida, een groep met overwegend bacterie-eters, maar waarvan sommige volwassen dieren ook facultatief carnivoor zijn. In onderstaande figuren zijn de groepen schematisch weergegeven.



Mononchida



Dorylaimida

Aphelenchida  
(*Seinura*)

Diplogasterida



### 3. RESULTATEN.

#### 3.1 Het selecteren van de aaltjes voor de indicator.

In de afgelopen 20 jaren werden voor zo'n 150 projecten door BLGG milieuaaltjes geteld, inclusief roofaaltjes. Een groot deel van de projecten bleek niet direct geschikt om te worden gebruikt. Dit waren projecten afkomstig van verontreinigingsstudies of de monsters kwamen niet van akkerbouwgronden. De selectie die overbleef, werd onderzocht op roofaaltjes. De resultaten staan in tabel 1. Bij de aaltjes is de hoofdgroep (orde, zie box 2) aangegeven waarin het aaltje is ingedeeld. Ook is de voedselgroep waartoe ze behoren, aangegeven.

**Tabel 1.** Overzicht van de meest algemene roofaaltjes in Nederlandse akkerbodems. De indeling van de voedselgroepen is gebaseerd op Yeates et al (1993)

Naam (taxon)	Hoofdgroep (orde)	Voedselgroep
<i>Anatonchus tridentatus</i>	Mononchida	Carnivoor
<i>Aporcelaimellus</i> spp	Dorylaimida	Carnivoor
<i>Aporcelaimellus obtusicaudatus</i>	Dorylaimida	Carnivoor
<i>Clarkus papillatus</i>	Mononchida	Carnivoor
Diplogasteridae spp	Diplogasterida	Bacterie-eter en Carnivoor
<i>Discolaimus</i> spp	Dorylaimida	Carnivoor
Dorylaimoidea spp	Dorylaimida	Omnivoor en Carnivoor
<i>Ecumenicus monohystera</i>	Dorylaimida	Omnivoor
<i>Eudorylaimus</i> spp	Dorylaimida	Carnivoor
<i>Mesodorylaimus</i> spp	Dorylaimida	Omnivoor
<i>Mononchus</i> spp	Dorylaimida	Carnivoor
<i>Mononchus aquaticus</i>	Mononchida	Carnivoor
<i>Mononchus truncatus</i>	Mononchida	Carnivoor
<i>Mylonchulus</i> spp	Mononchida	Carnivoor
<i>Mylonchulus sigmaturus</i>	Mononchida	Carnivoor
<i>Prodorylaimus</i> spp	Dorylaimida	Omnivoor
Qudsianematidae spp	Dorylaimida	Omnivoor
<i>Seinura</i> spp	Aphelenchida	Carnivoor
<i>Seinura tenuicaudata</i>	Aphelenchida	Carnivoor
<i>Thonus</i> spp	Dorylaimida	Omnivoor

De meeste roofoaltjes die in de Nederlandse akkers werden gevonden, behoorden tot de ordes Dorylaimida en Mononchida. Daarom werd hiermee verder gegaan. Vervolgens werd er voor de aaltjes uit tabel 1 onderzocht of er DNA profielen en primers aanwezig waren. Dit werd gedaan op de basis van de bijna volledige sequenties van het “small subunit” ribosomaal DNA (SSU rDNA) gen. Binnen de suborde Dorylaimida bevatte het SSU rDNA bijzonder weinig fylogenetisch signaal en daarom werd voor deze groep een gedeelte ( $\approx 1000$  baseparen) van het meer variabele “large subunit” ribosomaal DNA (LSU rDNA) gen geanalyseerd. Voor een aantal aaltjes was de informatie bekend, maar voor een aantal andere ontbraken deze. Wel bleken er DNA profielen en primers bekend te zijn van een aantal groepen met daarin ook aaltjes uit tabel 1. In overleg met Wageningen Universiteit werd besloten om met deze 7 DNA-groepen verder te gaan werken. Het bleek namelijk dat van een aantal aaltjes uit tabel 1 onvoldoende materiaal voorhanden was om goede primers en kalibratielijnen te ontwikkelen. Ook speelde mee dat om de indicator betaalbaar te houden er niet te veel aaltjessoorten gemeten mochten worden.

**Tabel 2.** Overzicht van de aaltjes in de verschillende DNA-groepen.

DNA-groep	Hoofgroep (Orde)	Familie	Geslachten
M1	Mononchida	Mylonchulidae	<i>Mylonchulus</i>
M2	Mononchida	Mononchidae	<i>Mononchus</i>
M3	Mononchida	Mononchidae	<i>Clarkus, Prionchulus, Coomansus</i>
M4	Mononchida	Anatonchidae	<i>Anatonchus</i>
D1	Dorylaimida	Actinolaimidae	<i>Paractinolaimus, Dorylaimus, Labronema,</i>
		Dorylaimidae	<i>Opisthodorylaimus, Mesodorylaimus,</i>
		Qudsianematidae	<i>Dorylaimoides, Paraxonchium, Ecumenicus</i>
		Mydonomidae	
D2	Dorylaimida	Aporcelaimidae	<i>Aporcelaimellus, Allodorylaimus</i>
		Qudsianematidae	
D3	Dorylaimida	Qudsianematidae	<i>Epidorylaimus, Eudorylaimus, Prodorylaimus,</i>
		Dorylaimidae	<i>Enchodelus</i>
		Nordiidae	

De groepen waarmee verder werd gegaan, waren verdeeld over twee ordes: Mononchida, met de groepen M1 t/m M4, en Dorylaimida, met de groepen D1 t/m D3. Elke groep bestond

uit één of meer verschillende aaltjes (tabel 2). Voor de 7 DNA-groepen werden primers en testen ontwikkeld voor gebruik in de indicator.

### 3.2 Het vrijmaken van het DNA van de aaltjes voor de indicator.

De methode om het DNA vrij te maken uit schadelijke aaltjes werd verder ontwikkeld voor de aaltjes uit de 7 DNA-groepen. Hiervoor werden de aaltjes na het opspoelen met de Oostenbrinktrechter geconcentreerd door de suspensie te centrifugeren bij 4.000 tpm. Het volume werd zo teruggebracht van circa 100 ml tot ongeveer 1,5 ml. De geconcentreerde suspensie werd overgebracht in zogenaamde epjes (kleine plastic buisjes) en nog verder geconcentreerd tot enkele µl. Bij het concentraat werd vervolgens een hoeveelheid lysis met buffervloeistof gedaan. Door te verwarmen gingen de celmembranen kapot en kwam het DNA vrij. Tot slot vond nog een zuiveringsstap plaats om stoffen te verwijderen die het vervolgtraject konden verstoren. Het zo verkregen DNA werd direct gebruikt voor de kwantitatieve PCR of ingevroren bij -20°C. De methode werd getest op praktijkmonsters en bleek goed te werken. Dit maakte het mogelijk om de schadelijke aaltjes en roofaaltjes in dezelfde suspensie te tellen. In tabel 3 staan de resultaten van een aantal praktijkmonsters.

**Tabel 3.** Overzicht van de aantallen roofaaltjes uit een serie grondmonsters die gespoeld zijn met de Oostenbrinktrechter en behandeld volgens de methode om DNA vrij te maken.

monster	Dorylaimida	Mononchida
2	34	34
3	6	28
4	34	24
5	30	2
6	56	26
7	8	42
8	30	60
9	8	8
10	36	2
12	66	2
13	6	12
14	18	10
15	10	32

### 3.3 Het tellen en op naam brengen van de aaltjes voor de indicator.

Voor het ontwerp van de primers werd gebruik gemaakt van het software pakket ARB. Een primer is een klein stukje DNA, bijvoorbeeld 'cgatccgctcgggtgtaaatt', dat gebruikt wordt als startpunt voor de polymerase-kettingreactie (PCR). Er zijn steeds twee primers nodig. De beste primer voor een PCR is een korte streng, waarvan de sequentie alleen overeenkomt met het stuk DNA voor het DNA-fragment en na het DNA-fragment dat men wil dupliceren. Is dit namelijk niet het geval, dan zal de primer op meerdere plaatsen binden aan het DNA en dus stukken gaan dupliceren die niet gewenst zijn. Afgezien van deze specifieke vereisten, werden primer-combinaties ontworpen op een optimale PCR temperatuur van 63°C. Deze benadering maakte een kwantitatieve detectie van combinaties van taxa met hetzelfde PCR temperatuurprofiel mogelijk. Er werden primers getest en/of ontwikkeld voor de aaltjes uit de 7 DNA-groepen. De ontwikkelde primers staan in tabel 4.

**Tabel 4.** Overzicht van de primergroepen en kalibratielijnen. De nummers van de primer-combinaties verwijzen naar specifieke primers.

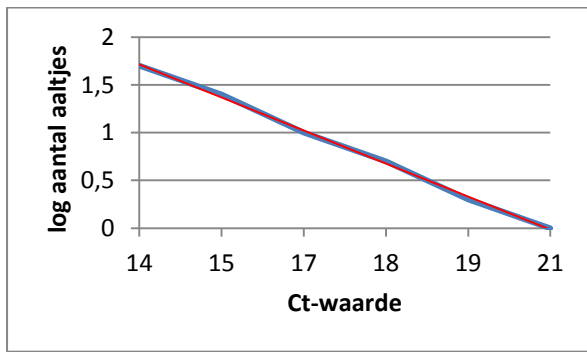
DNA-groep	primercombinatie	Kalibratielijijn bij 63°C
M1	259/262	$y = -4,0213x + 12,029$
M2	317/320	$y = -3,6632x + 12,904$
M3	1080/1082	$y = -3,491x + 17,869$
M4	322/330	$y = -4,2714x + 12,156$
D1	811/21	$y = -3,7264x + 20,551$
D2	613/617	$y = -2,8978x + 14,942$
D3	395/397	$Y = -6,239x + 14,502$

De kalibratielijnen werden in nauwe samenwerking met de WUR ontwikkeld. Hiervoor werden series van 1, 5, 10, 50 en 100 individuele aaltjes uit hetzelfde geslacht gemaakt en met realtime PCR gemeten. De aaltjes waren op naam gebracht onder de microscoop. Bij de realtime-PCR-methode, ook wel kwantitatieve PCR-methode (qPCR) genoemd, kan tijdens de PCR het DNA al worden aangetoond en gekwantificeerd. Tijdens de realtime PCR binden gelabelde probes zich aan een specifiek stuk DNA en zijn niet waar te nemen als de probe intact is. Zodra de PCR-reactie op gang komt, wordt de probe afgebroken en wordt het label zichtbaar. Fluorescerende labels gaan licht van een bepaalde golflengte uitzenden. Hoe meer DNA wordt omgezet, des te sterker het signaal. Dat signaal wordt grafisch uitgezet tegen de

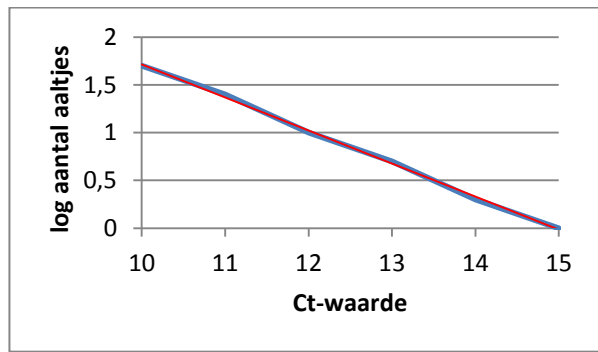


drempelwaarde, aangeduid met Ct-waarde, waarbij nog een signaal meetbaar is. Als er van een aaltje weinig DNA aanwezig is, zal het langer duren voordat de drempelwaarde is bereikt (hoger Ct-waarde). Bij bekende aantallen aaltjes kunnen zo Ct-waarden worden bepaald en in een kalibratielijn worden geplott en het aantal aaltjes worden afgelezen. Volgens de bovengenoemde methode werden de kalibratielijnen voor de 7 DNA-groepen ontwikkeld.

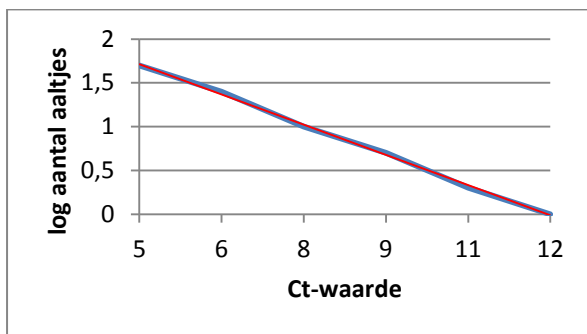
De kalibratielijnen staan in tabel 4 en figuren 4 t/m 10.



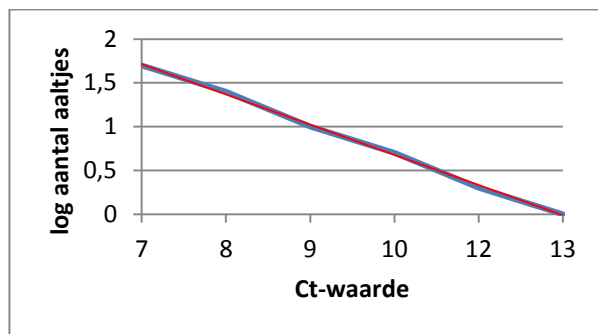
Figuur 4. Kalibratielijn voor D1.



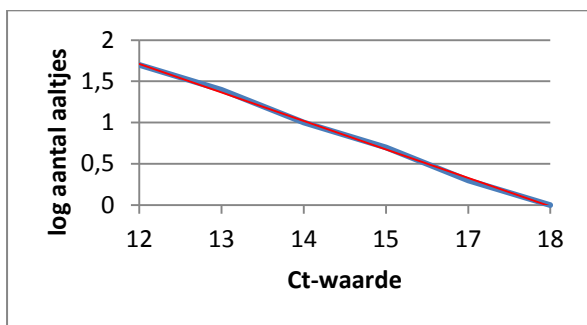
Figuur 5. Kalibratielijn voor D2.



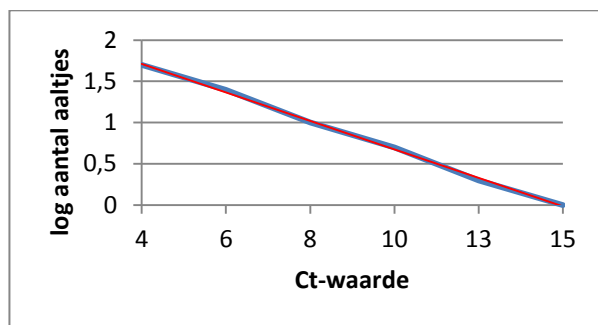
Figuur 6. Kalibratielijn voor M1.



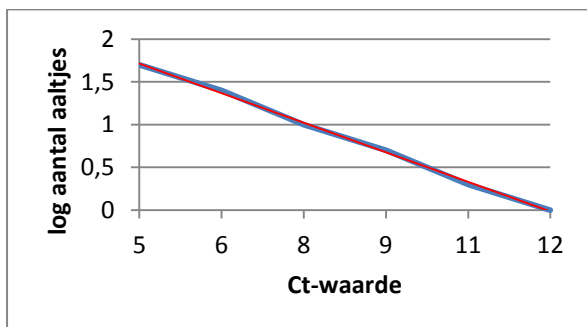
Figuur 7. Kalibratie M2.



Figuur 8. Kalibratielijn voor M3.



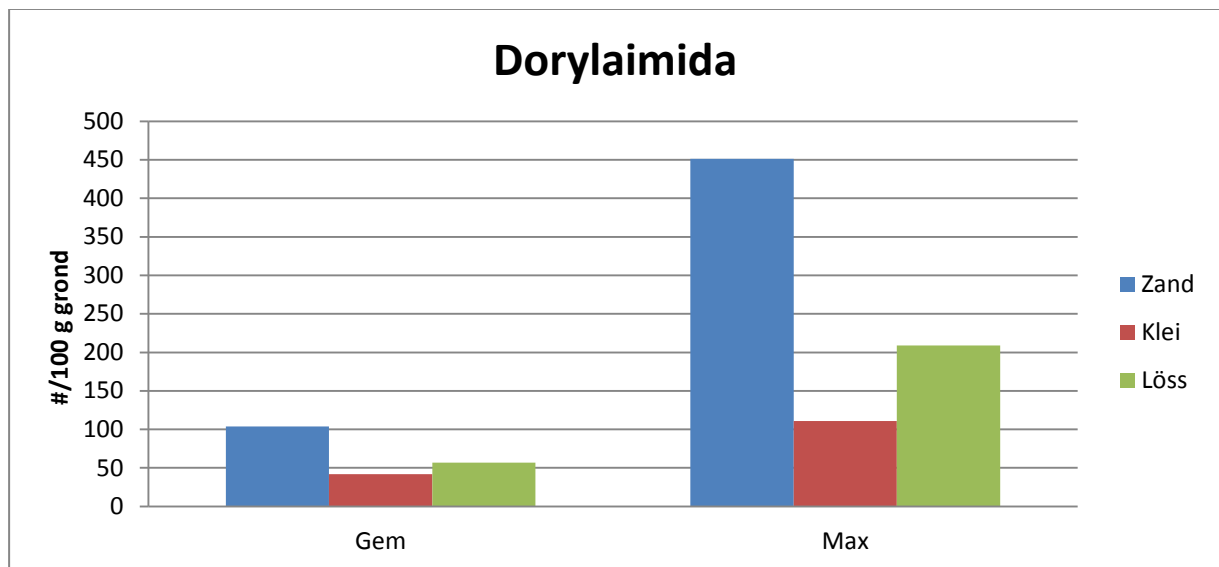
Figuur 9. Kalibratielijn voor D3.



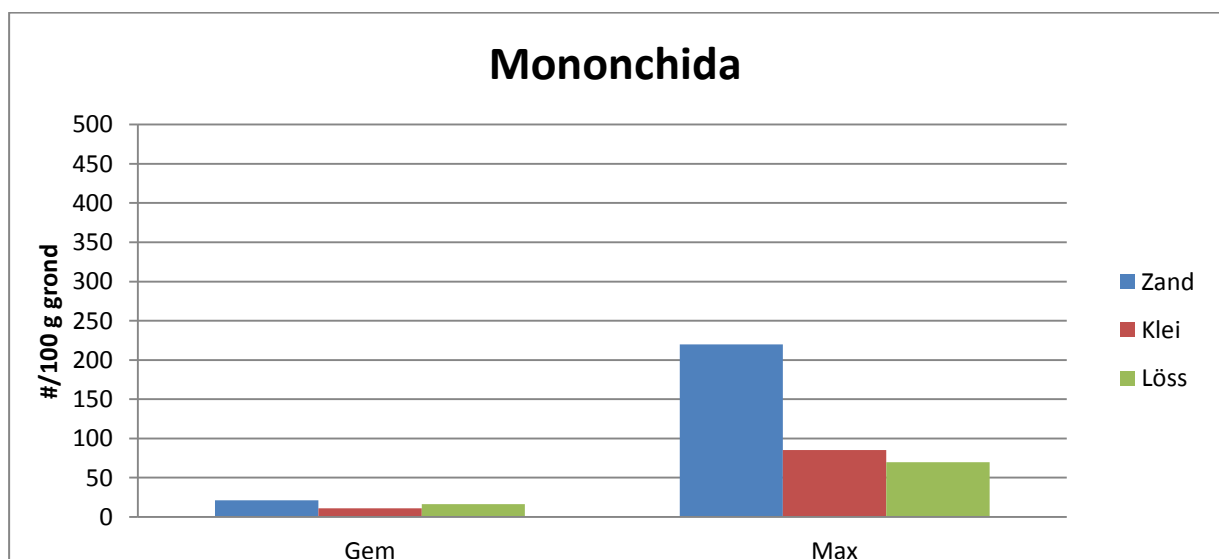
Figuur 10. Kalibratielijn voor M4.

### 3.4. De betekenis van de indicator.

Veel beoordelingssystemen zijn gebaseerd op totale aantallen van één of meerdere soorten. Hiervoor wordt het begrip abundantie gebruikt. Dit is een maat voor het voorkomen van soorten in een bepaald gebied. In de meeste monsters domineerden aaltjes uit de orde Dorylaimida. Op zandgronden varieerde het aantal Dorylaimida van 0 tot 451. Het aantal Mononchida op zandgronden lag tussen 0 en 220 per 100 g verse grond. De aantallen Dorylaimida en Mononchida lagen op de kleigronden duidelijk lager, respectievelijk tussen 0 en 111, en tussen 0 tot 85 per 100 g verse grond. Voor lössgronden was dit voor Dorylaimida 0 tot 209 en voor Mononchida 0 tot 70. In figuur 11 en 12 is dit afgebeeld.



Figuur 11. Abundantie van Dorylaimida in de verschillende grondsoorten.



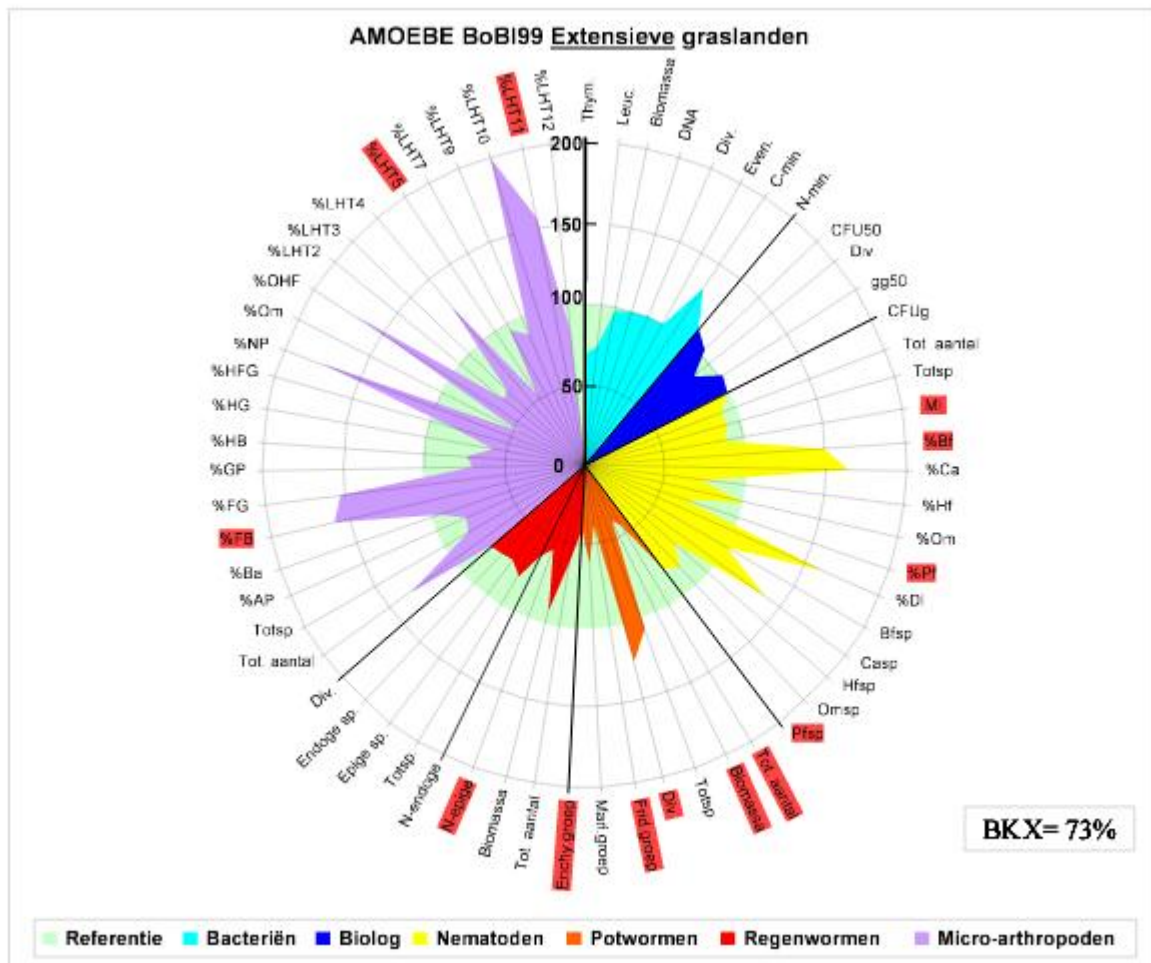
Figuur 12. Abundantie van Mononchida in de verschillende grondsoorten.

Om iets te kunnen zeggen over de abundantie van roofaaltjes in een willekeurig grondmonster, is een referentie nodig. De gevonden aantallen roofaaltjes worden hiermee vergeleken en beoordeeld. Dit lijkt veel op de advisering van schadelijke aaltjes. De keuze van de referentie is dus belangrijk. Omdat de aantallen roofaaltjes verschilden per grondsoort, werd voor de referentie onderscheid naar grondsoort gemaakt. Het gemiddelde aantal Dorylaimida en Mononchida per grondsoort werd gebruikt als referentiewaarde (tabel 5).

**Tabel 5.** Referentiewaarden in aantallen per 100 g grond voor de indicator per grondsoort.

Indicator	zandgrond	kleigrond	Lössgrond
Dorylaimida	104	42	57
Mononchida	21	11	16
Roofaaltjes	125	53	73

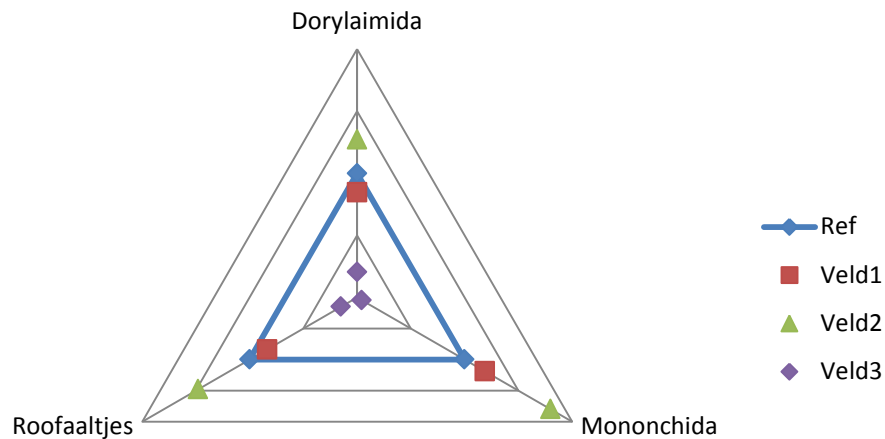
De uitslag van een willekeurig grondmonster kan worden vergeleken met de referentie, waarbij de mate van afwijking gebruikt wordt bij de beoordeling. Grafisch kan dit in een amoebe-diagram zichtbaar worden gemaakt. Een amoebe-diagram geeft de procentuele afwijking van een meetwaarde ten opzichte van de referentiewaarde. De figuur bestaat uit een cirkel die de referentie (100%) vertegenwoordigt en een aantal segmenten die de afzonderlijke meetwaarden als percentage van de referentie. Het voordeel van een amoebe-diagram is dat het op een compacte wijze snel een overzicht geeft van de mate van afwijking (Schouten et al, 2003). In figuur 13 is hiervan een voorbeeld gegeven. In Excel is dit te benaderen door een radargrafiek. De aantallen roofaaltjes kunnen via een amoebe-diagram beoordeeld en gepresenteerd worden. Voordeel van deze benadering is dat in de toekomst ook andere indicatoren, bijvoorbeeld het aantal bacterie- en schimmeleters, in dezelfde figuur kunnen worden gezet. Een voorbeeld is hieronder uitgewerkt. In tabel 6 staan de resultaten van de referentie (Ref) en 3 willekeurige kleimonsters (Veld1, Veld2, Veld3). Deze gegevens zijn in figuur 14 uitgezet in een radargrafiek.



**Figuur 13.** Voorbeeld van een amoebe-diagram. De referentie is de lichtgroene cirkel en op 100 gesteld. De taartpunten zijn allemaal verschillende bepalingen. Uit: Schouten et al, 2003.

**Tabel 6.** Meetresultaten van 3 monsters uit kleigronden.

Indicator	Aantallen gemeten (per 100 g grond)				Aantallen procentueel			
	Ref	Veld1	Veld2	Veld3	Ref	Veld1	Veld2	Veld3
Dorylaimida	104	88	112	23	100	85	127	21
Mononchida	21	25	45	2	100	119	180	4
Roofaaltjes	125	113	157	25	100	84	148	15



**Figuur 14.** Amoebe-diagram (radargrafiek) van de 3 kleigrondmonsters uit tabel 6. De blauwe lijn is de referentie en is op 100 gesteld.

Uit het amoebe-diagram (figuur 6) is direct af te lezen dat de waarden van veld 3 sterk afwijken van de referentie. Veld 2 scoort iets hoger dan de referentie en veld 1 komt vrijwel overeen met de referentie. Om een betekenis aan de indicator te kunnen geven, werden een groot aantal correlaties onderzocht. Tabel 7 geeft een samenvatting van de significante correlaties. In bijlage 3 staan de oorspronkelijke gegevens met hun waarden. Voor lössgronden werd dit niet uitgewerkt omdat er te weinig gegevens waren. De correlaties tussen de roofaaltjes en de aaltjesparameters lagen voor de hand. De roofaaltjes maakten namelijk direct onderdeel hiervan uit. Dit gold dan voor de gevonden taxa en de parameters die betrekking hebben op de verdeling over de cp-klassen (colonizer-persisters) en de Maturity Index MI (voor uitleg, zie Bongers, 1990). In zandgrond waren bij Dorylaimida Dorylaimoidea en *Aporcelaimellus* de belangrijkste groepen. Bij Mononchida waren dit *Clarkus* en *Mylonchulus*. Voor de kleigronden lag dit iets complexer en droegen meer taxa bij aan de totalen.

**Tabel 7.** Samenvatting van de belangrijkste significante correlaties tussen het aantal Mononchida en Dorylaimida en bodemparameters.

Parameter	Zandgrond		Kleigrond	
	Dorylaimida	Mononchida	Dorylaimida	Mononchida
<b>Algemeen:</b>				
Jaar bemonstering	+		-	+
Voor of najaar	-		+	
pH			+	
<b>Chemisch:</b>				
Organische stof	+		-	
P-totaal			-	
C-totaal	+		-	
N-totaal			-	
C/N			+	
<b>Biologisch:</b>				
schimmelbiomassa				+
Hot Water extractable Carbon	-			
Pot. N mineralisatie	+		-	
Pot. Mineraliseerbare N (PMN)	+			+
<b>Aaltjes:</b>				
Nematoden totaal	+			
Aantal cp 1	+			
Aantal cp 2	+		-	-
Aantal cp 3	+		+	
Aantal cp 4	+		+	+
Aantal cp 5	+		+	
Maturity Index (1-5)			+	+
Maturity Index (1-5d)			+	+
Maturity Index (2-5)	+		+	+
Anatonchus M4				+
Clarkus M3		+		+
Mononchida M2				+
Mylonchulus M1		+	+	
Aporcelaimellus D2	+		+	
Dorylaimoidea	+		+	
Ecumenicus D1			+	
Eudorylaimus D3			+	

Een aantal correlaties zijn vanuit landbouwkundig oogpunt interessant. Naarmate zandgrond een hoger gehalte aan organische stof heeft, werden meer *Dorylaimida* gevonden. Bij kleigronden was dit niet zo. Mogelijk dat zandgronden met meer organische stof beter vocht vasthielden. Dit is gunstig voor aaltjes. Voor kleigronden was dit minder van belang omdat deze van nature vochtiger zijn.

De invloed van roofoaaltjes op bodemprocessen en planten is niet direct (zie figuur 1). Belangrijke bodemprocessen, zoals stikstofmineralisatie, worden door micro-organismen uitgevoerd. Factoren die deze micro-organismen beïnvloeden, hebben ook invloed op de bodemprocessen. Voor zandgronden werden hierop geen effecten van Mononchida gevonden. *Dorylaimida* hadden een positief effect op de potentiële stikstofmineralisatie en de potentiële mineraliseerbare N (PMN). De potentiële N-mineralisatie is gedefinieerd als de stikstofmineralisatie tijdens aerobe incubatie van grond bij 20 ° C onder laboratoriumomstandigheden en is een maat voor afbreekbare organische stikstof (Veldhof, 2003). PMN is de hoeveelheid stikstof die aanwezig is in de bacteriën en schimmels die in landbouwgrond voorkomen als een maat voor de hoeveelheid schimmels en bacteriën en hun capaciteit om organische stikstof om te zetten naar voor de plant beschikbare stikstof. *Dorylaimida* hadden in de zandgronden een gunstig effect op de stikstofmineralisatie. Voor de kleigronden lag dit anders. Alleen Mononchida bleken een gunstig effect te hebben op de stikstofmineralisatie (PMN). Voor *Dorylaimida* werd een negatief effect gevonden op de potentiële N mineralisatie. Het gunstige effect van *Dorylaimida* en Mononchida op de stikstofmineralisatie wordt mogelijk verklaard doordat ze de begrazers van bacteriën (aaltjes, protozoën) in toom houden. Het is niet bekend waarom bij kleigronden een ongunstig effect van *Dorylaimida* op de potentiële stikstofmineralisatie werd gevonden.

Opvallend was op zandgrond de negatieve correlatie van *Dorylaimida* met HWC (Hot Water-extractable Carbon). HWC wordt gebruikt als 'maat' voor de makkelijk afbreekbare koolstof die als voedsel voor micro-organismen kan dienen. Volgens Ghani, Dexter & Perrott (2003) is de HWC positief gecorreleerd zijn met onder andere de microbiële biomassa, de microbiële N, en de mineraliseerbare N. Een hoge HWC zou dan betekenen een grote microbiële biomassa. Deze grote microbiële biomassa zou dan kunnen ontstaan omdat er weinig bacterie-etters zijn, die op hun beurt weer prooi voor *Dorylaimida* zijn. Het bleek namelijk dat bacterie-etters (dit zijn aaltjes uit de cp1 en cp2) positief gecorreleerd waren met



Dorylaimida. In tabel 8 zijn de belangrijkste relaties aangegeven die gebruikt kunnen worden voor een advies.

**Tabel 8.** De belangrijkste relaties die gebruikt kunnen worden voor een normering. Referentie: aantal gemiddeld per 100 g grond. + = positieve significante correlatie. - = negatieve significante correlatie. O = geen correlatie.

aaltje	Referentie		Organische stof		N-mineralisatie		Afbreekbare C	
	zand	klei	zand	klei	zand	klei	zand	Klei
Dorylaimida	104	42	+	-	+	-	-	o
Mononchida	21	11	o	o	o	+	o	o

### 3.5. De implementatie op het routine laboratorium.

Binnen het project werd veel tijd besteed aan de implementatie en kwaliteitscontrole van de DNA-testen. Uit eerdere ervaringen bleek namelijk dat het overzetten van DNA-testen uit laboratoriumomstandigheden (WUR) naar routineomstandigheden (BLGG AgroXpertus) niet zo eenvoudig was. Van deze eerdere ervaringen met het ontwikkelen en implementeren van DNA-testen voor schadelijke aaltjes, werd dankbaar gebruik gemaakt. Bij de implementatie en het testen van de indicator was vooral aandacht voor de technische kant. Bekend van het ontwikkelen van DNA-testen voor schadelijke aaltjes was dat bij monsters waarin veel andere aaltjes aanwezig waren, de doelaaltjes prima aan te tonen waren, ook als deze in zeer lage aantallen aanwezig waren. Dit gold ook voor de roofoaltjes in de nieuwe DNA-testen. De methode om DNA vrij te maken uit aaltjes, werkte ook naar tevredenheid bij de nieuwe DNA-testen voor roofoaltjes. Het lastige hierbij is verder dat de tellingen met de microscoop vaak als 'waarheid' worden beschouwd. Er wordt verwacht dat nieuwe DNA-testen pas 'goed' zijn als ze ongeveer dezelfde aantallen meten. In tabel 9 en 10 staan een aantal vergelijkingsmonsters waaruit blijkt dat dit niet altijd zo is.

**Tabel 9.** Aantallen roofaaltjes (n/100 g grond) met microscoop en PCR-DNA voor een serie monsters uit de bollenstreek.

monster	Dorylaimida		Mononchida		Totaal roofaaltjes	
	Microscoop	PCR-DNA	Microscoop	PCR-DNA	Microscoop	PCR-DNA
1	175	2	49	6	224	8
2	91	34	109	34	199	68
3	142	6	121	28	264	34
4	223	34	18	24	241	58
5	273	30	29	2	302	32
6	269	56	48	26	317	82
7	209	8	44	42	253	50
8	195	30	31	60	226	90
9	106	8	12	8	119	16
10	203	36	0	2	203	38
11	83	0	5	4	88	4
12	140	66	10	2	150	68
13	42	6	42	12	84	18
14	48	18	12	10	60	28
15	50	10	44	32	94	42

**Tabel 10.** Aantallen roofaaltjes (n/100 g grond) met microscoop en PCR-DNA voor een serie monsters uit akkerbouw op klei.

monster	Dorylaimida		Mononchida		Totaal roofaaltjes	
	Microscoop	PCR-DNA	Microscoop	PCR-DNA	Microscoop	PCR-DNA
1	29	126	0	0	29	126
2	280	126	47	31	327	157
3	413	21	76	7	489	28
4	346	49	0	104	346	153
5	794	166	0	13	794	179
6	139	56	0	15	139	71
7	56	17	0	7	56	24

Tijdens het project zijn regelmatig praktijkmonsters geanalyseerd op roofaaltjes als aanvullende bepaling bij het landbouwkundige aaltjesonderzoek. Een samenvatting van de resultaten staat in tabel 11.

**Tabel 11.** Samenvatting van de resultaten van praktijkmonsters die bij BLGG AgroXpertus tussen januari en oktober 2012 op roofaaltjes zijn geanalyseerd met de nieuwe DNA-testen.

	Dorylaimida D1	Dorylaimida D2	Dorylaimida D3	Mytonchulidae M1	Mononchidae M2	Mononchidae M3	Anatonchidae M4	Dorylaimida D	Mononchida M	Roofaaltjes
Aantal monsters	264	264	264	264	264	264	264	264	264	264
Roofaaltjes aanwezig	225	183	185	92	19	176	8	242	204	243
%	85,2	69,3	70,1	34,8	7,2	66,7	3,0	91,7	77,3	92,0
Gemiddeld aantal	38,3	2,7	68,2	0,7	0,2	21,9	0,1	109,1	22,9	132,0
Standaardafwijking	60,8	6,5	126,2	1,5	1,6	40,1	0,6	151,2	40,0	165,5



**Figuur 15.** Implementatie in het routine laboratorium. Foto: BLGG AgroXpertus.

### 3.6. Kennisoverdracht.

Op 2 maart 2012 en 11 november 2012 werden er tijdens de bijeenkomsten in Nijkerk van de Begeleidingscommissie Onderzoek van het Aaltjesactieplan een power-pointpresentatie gegeven over de voortgang van het project. Een vergelijkbare presentatie werd in Wageningen gegeven op de Landelijke buitendienstdag van BLGG AgroXpertus. Vervolgens is de kennis over de roofaaltjesindicator gedeeld via een artikel op de website en is er een Expresse aan roofaaltjes gewijd (bijlage 4). Met name in het Zuidoosten van Nederland leeft de indicator en is er veel belangstelling naar.

## 4. CONCLUSIES.

Door het analyseren van bestaande milieuaaltjesdata kon een goed overzicht worden gemaakt van de roofaaltjes die in Nederlandse akkers voorkomen. Het grootste deel van de roofaaltjes, zowel in aantallen soorten als hun abundanties, behoorden tot de orde Dorylaimida. Dit is een omvangrijke groep nematoden met planteneters (Trichodoridae, Longidoridae), schimmeleeters (Diphtherophoridae) en vleeseters. Dorylaimida worden gezien als gevoelig voor snelle veranderingen ('stress') in hun omgeving, mede omdat ze vaak een lange generatietijd hebben (> 1 jaar). Maar er zijn gevallen bekend waarin ze juist dominant waren en kunnen bepaalde soorten onder specifieke omstandigheden goed overleven. Voorbeeld is een proef met vervuilde grond door zink, waarin een bepaalde Dorylaimida-soort sterk overheerste. Waarschijnlijk voedde deze zich met algen (mond. med. Drs. A.J. Schouten, RIVM).

Met de keuze om voor de indicator 7 groepen roofaaltjes te gebruiken, wordt aan 2 belangrijke voorwaarden voldaan: (1) de indicator moet een goed beeld geven van de aanwezige soorten roofaaltjes, en (2) het aantal bepalingen mag niet te groot zijn in verband met de praktische uitvoer en daarmee de kosten. Het effect dat niet alle roofaaltjes worden gemeten is gering omdat tijdens de inventarisatie van de roofaaltjes in Nederlandse akkers geen dominante taxa zijn gevonden die niet worden gemeten.

De nieuwe DNA-testen die zijn ontwikkeld om roofaaltjes te meten, voldoen in de praktijk. Ze kunnen goed ingepast worden in het landbouwkundige routineonderzoek op schadelijke aaltjes. Er is geen speciale monstername of voorbehandeling nodig en de roofaaltjes kunnen in dezelfde suspensie als de schadelijke aaltjes worden gemeten. De ontwikkelde primers blijken in de praktijk goed te werken.

Het vaststellen van de absolute aantallen aaltjes in een grondmonster is lastig. Dit geldt zowel voor het microscopisch onderzoek als voor de testen die gebruikmaken van qPCR. Bij het microscopisch onderzoek is de mens vaak een onzekere factor. Alleen een klein deel van een grondmonster kan echt worden geteld en fouten zijn snel gemaakt. Bij qPCR is het vooral de kwaliteit van de kalibratielijnen die de nauwkeurigheid bepaalt. Uitvoerig

onderzoek bij *Meloidogyne* gaf aan dat vooral bij lage aantallen qPCR 'beter' scoorde dan tellen met de microscoop. Naarmate het aantal *Meloidogyne* toenam, werden de verschillen minder (Blgg, 2008). Tijdens het project zijn serie monsters op roofaaltjes zowel microscopisch als met qPCR onderzocht (zie paragraaf 3.5.). Dat de resultaten lang niet altijd overeenkwamen, is niet uitzonderlijk. In de uitvoer verschillen de methoden op een aantal punten namelijk fundamenteel van elkaar:

- Bij het microscopisch onderzoek wordt slechts een heel klein deel van het monster onderzocht. Per monster worden random maximaal 150 individuen op naam gebracht en dit wordt teruggerekend naar het oorspronkelijke aantal in het monster.
- Bij de DNA-testen wordt de hele suspensie onderzocht en is er geen beperking in het aantal individuen dat wordt gedetermineerd. Wel worden alleen de taxa herkend waarvoor primers toegevoegd zijn.
- Bij het microscopisch onderzoek wordt veelvuldig gebruik gemaakt van de verzamelgroep Dorylaimoidea: alle dorylaimiede nematoden die niet verder gedetermineerd kunnen worden, worden hierin geplaatst. Een dergelijke verzamelgroep kent de nieuwe indicator niet.

Dit geeft aan dat de DNA-testen niet als vervanging van het gangbare nematodenonderzoek met de microscoop moeten worden gezien, maar als een nieuwe vorm van (aanvullend) onderzoek. Microscopisch onderzoek leent zich goed om de totale nematodenfauna in beeld te brengen en als soortdeterminatie of biomassabepaling gevraagd is. Hierbij speelt snelheid en prijs een minder grote rol.

Een belangrijke voorwaarde voor het succes van de nieuwe indicator is of het mogelijk is om een betekenis te hechten aan de waarde van de indicator. De analyse van bestaande data door het Louis Bolk Instituut gaf een aantal richtingen om te gebruiken in een waardering. Deze zijn samengevat in tabel 8. De referentiewaarden per grondsoort kunnen eenvoudig worden gebruikt in een waardering. Scores lager dan de referentie moeten dan als ongunstig worden gezien, scores op of boven de referentie als gunstig. Overigens moet hieraan wel een plafond worden gesteld, omdat zeer hoge aantallen roofaaltjes (factor 5-10 keer referentie) onnatuurlijk zijn en wijzen op stress. In paragraaf 3.4. is het amoëbe-diagram gebruikt om dit te presenteren. Uiteraard zijn er ook andere mogelijkheden. Uit de analyse van het Louis Bolk Instituut bleek verder dat er verbanden bestaan tussen roofaaltjes en

stikstofmineralisatie. Op zandgronden was er een positieve correlatie met Dorylaimida, voor kleigronden met Mononchida. Er wordt verondersteld dat het effect van roofaaltjes op de stikstofmineralisatie via hun voedsel gaat, namelijk aaltjes die bacteriën eten. Het is bekend dat bacteriofagen de stikstofmineralisatie beïnvloeden (De Ruiter et al, 1993). Op basis van de huidige analyse kan dit niet getalsmatig worden uitgewerkt in een waardering, maar kan wel genoemd worden in een begeleidende tekst.

Op basis van het bovenstaande kan een eerste aanzet tot een waardering worden gegeven. Als basis worden de referentiewaarden uit tabel 5 genomen. De uitslag van een willekeurig grondmonster wordt hiermee vergeleken en eventueel in een radargrafiek of amoebediagram gepresenteerd. Is het een zandgrond en ligt het aantal Dorylaimida duidelijk onder de referentie, dan wordt dit vermeld. Ook wordt vermeld dat de stikstofmineralisatie niet optimaal is en dat het organische stofgehalte mogelijk te laag is. Het advies kan dan zijn om maatregelen te nemen om het bodemleven te bevorderen. Dit zal vrijwel altijd betekenen een ander management van de organische stof. Ligt het aantal Mononchida duidelijk onder de referentie, dan wordt alleen dit vermeld, zonder verdere conclusies. Bij een kleigrond wordt dan geadviseerd als voor Dorylaimida bij zandgronden. In alle andere gevallen wordt alleen aangegeven dat er van de referenties wordt afgeweken.

Binnen het project is geen onderzoek gedaan naar de effecten van roofaaltjes op schadelijke aaltjes. De geanalyseerde gegevens gaven hiervoor geen mogelijkheid omdat juiste informatie over schadelijke aaltjes niet aanwezig was.

Met dit project is een eerste stap gezet om aaltjes te gebruiken als laagdrempelige indicator voor de landbouw. De resultaten zijn zodanig dat aanbevolen wordt om verder onderzoek te doen naar met name de volgende onderdelen:

- Het verbeteren van de ijklijnen, bijvoorbeeld door het gebruik van de biomassagegevens van aaltjes uit BoBi.
- Verdere analyse van de correlaties die gevonden zijn tijdens de analyse van het Louis Bolk Instituut.
- Analyse van de praktijkmonsters bij BLGG AgroXpertus waarin de nieuwe indicator (roofaaltjes) als aanvullende bepaling is aangevraagd.
- Nagaan of het haalbaar is om ook voor de andere functionele groepen DNA-testen te ontwikkelen zodat meerdere voedingsniveaus in de indicator vertegenwoordigd zijn





---

## 5. LITERATUUR.

Beare, M. H. 1997. Fungal and bacterial pathways of organic matter decomposition and nitrogen mineralization in arable soil. Pp. 37–70. In L. Brussaard and R. Ferrera-Cerrato, eds. Soil ecology in sustainable agricultural systems. Boca Raton, FL: Lewis.

Bilgrami, A. L., and C. Brey, 2005. Potential of predatory nematodes to control plant parasitic nematodes. 2005 CABI (H ISBN 9780851990170).

Blgg, 2008. In-house validation of five molecular tests detecting *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *M. minor*, *M. naasi* and *M. hapla*. Blgg bv, Wageningen.

Bongers, T., 1988. De nematoden van Nederland. Utrecht: Koninklijke Nederlandse natuurhistorische Vereniging.

Bongers, T., 1990. Te maturity index: an oecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* (1990): 83: 14-19.

Bongers, T., M. Bongers, 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Biology* 10 (3): 239-251).

De Ruiter, PC, J.A. van Veen, J.C. Moore, L. Brussaard, H.W. Hunt, 1993. Calculations of nitrogen mineralization in soil foodwebs. *Plant and soil* 157: 263-273.

Ferris, H., R. C. Venette, H. R. van der Meulen, and S. S. Lau. 1998. Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: Verification and measurement. *Plant and Soil* 203:159–171.

Freckman, D.W., C.H. Ettema, 1993. Assessing nematode communities in agro ecosystems of

varying human intervention. *Agriculture, Ecosystems, and Environment* 45 (1993): 239-261.

Ho A Ghani, H.A., M Dexter, K.W Perrott, 2003. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. *Soil Biology and Biochemistry* 35 (9): 1231–1243.

Holterman, M., A. van der Wurff, S. van den Elsen, H. van Megen, T. Bongers, O. Holovachov, J. Bakker and J. Helder, 2006. Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. *Mol Biol Evol* (September 2006) 23 (9): 1792-1800.

s' Jacobs, J.J. en J. van Bezooijen, 1986. A manual for practical Work in Nematology. Praktikumhandleiding vakgroep Nematologie. Landbouwniversiteit Wageningen.

Khan, Z. and Y. Ho Kim, 2006. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology* 2006.

Mesman M, A.J. Schouten, M. Rutgers, en E.M. Dirven-van Breemen, 2008. Handreiking TRIADE. Locatiespecifiek ecologisch onderzoek in stap drie van het Saneringscriterium. RIVM Bilthoven.

Safni, I., 2002. The role of nematode predation in soil food webs. USU digital library.

Schouten, A.J., J. Bloem, W. Didden, G. Jagers op Akkerhuis, H. Keidel, M. Rutgers, 2003. Bodembioologische indicator 1999, RIVM rapport 607604003.

TCB, 2005. Advies duurzamer grondgebruik in de landbouw. Technische commissie bodembescherming, Den Haag.

Tietjen, J.H. 1977. Population distribution and structure of the free-living nematodes of Long Island Sound. *Mar. Biol.*, 43: 123-136.

Ugarte, C., E. Zaborski, 2009. Soil nematodes. eXtension. University of Illinois.

Velthof, G.L. 2003. Relaties tussen mineralisatie, denitrificatie en indicatoren voor bodemkwaliteit in landbouwgronden. Wageningen, Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte. Alterra-rapport 769. Sturen op Nitraat rapport nr. 6.; 38 blz.; .5 fig.; 3 tab.; 40 ref.

Vervoort MTW, Vonk JA, Mooijman PJW, Van den Elsen SJJ, Van Megen HHB, et al., 2012. SSU Ribosomal DNA-Based Monitoring of Nematode Assemblages Reveals Distinct Seasonal Fluctuations within Evolutionary Heterogeneous Feeding Guilds. PLoS ONE 7(10): e47555. doi:10.1371/journal.pone.0047555

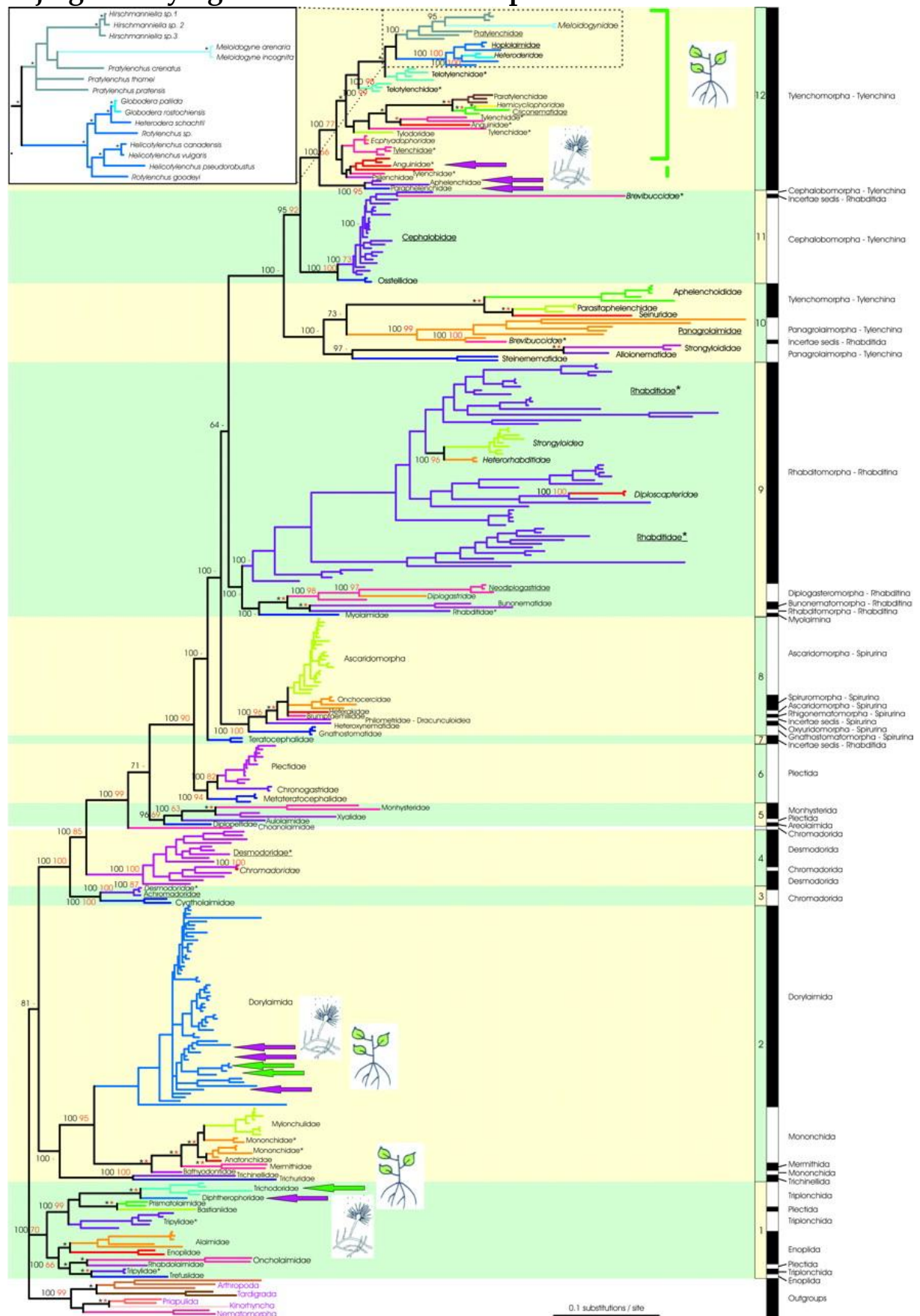
Yeates, G.W., T. Bongers, R.M.G. de Goede, D.W. Freckman, S.S. Georgieva, 1993. Feeding Habitats in Soil Nematode Families and Genera – An Outline for Soil Ecologists. *Journal of Nematology* 25: 315-331.

Wardle, D. A., and G. W. Yeates. 1993. The dual importance of competition and predation as regulatory forces in terrestrial ecosystems: Evidence from decomposer food-webs. *Oecologia* 93:303–306.

Zanen, M., M. Bos, J. Bokhorst, W. Cuijpers, L. Molendijk, G. Korthals, 2010. Ziektewerendheid in de aardbeiteelt. Bijeenkomst in het kader van project Weerbare Bodem op 9 februari 2010, Tilburg. Louis Bolk Instituut, Driebergen.



**Bijlage 1. Phylogenetische verwantschapsboom van nematoden.**



## Bijlage 2. Toegepaste transformaties.

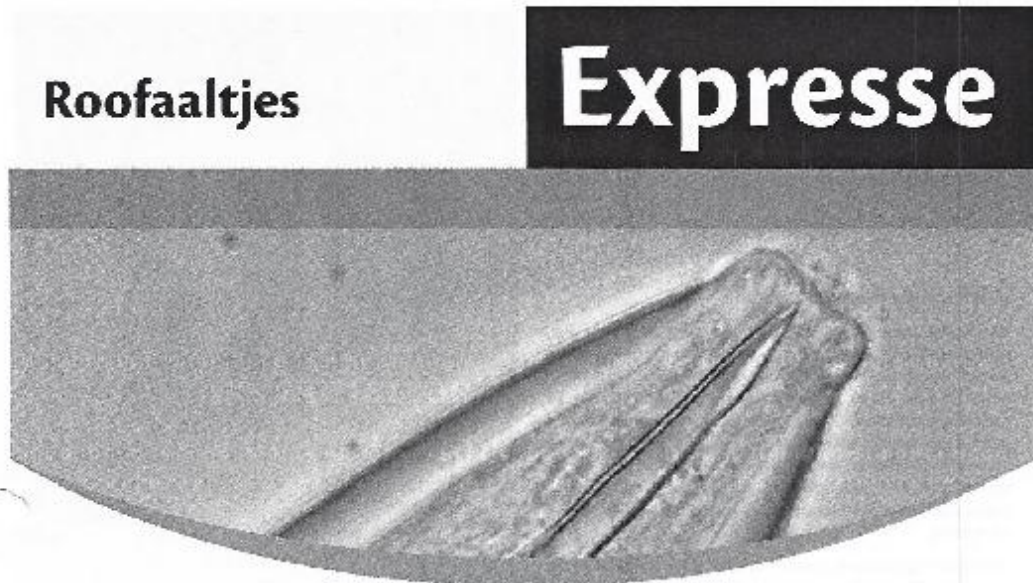
Parameter	linear x	log10(x)	log10(1+x)	log10(10+x)
P totaal	*			
P-AI	*			
P-PAE			*	
pH	*			
OS		*		
C totaal		*		
N totaal		*		
CN		*		
Lutum	*			
CEC		*		
Schimmel biomassa			*	
Schimmel activiteit			*	
Bacterie biomassa			*	
Pot. N mineralisatie			*	
Pot. Mineraliseerbare N			*	
Pot. C mineralisatie			*	
Unstained Fungi	*			
F_B		*		
HWC	*			
CO2		*		
Nematoden totaal			*	
CP1			*	
CP2			*	
CP3			*	
CP4			*	
CP5			*	
MI1-5		*		
MI1d-5		*		
MI2-5		*		
PPI		*		
Neodiplogasteridae				*
Anatonchus				*
Clarkus				*
Discolaimus				*
Mononchidae				*
Mononchus				*
Mylonchulus				*
Nygolaimus				*
Prionchulus				*
Seinura				*
Aporcelaimellus				*
Dorylaimoidea				*
Ecumenicus				*
Eudorylaimus				*
Mesodorylaimus				*
Prodorylaimus				*
Qudsianematidae				*
Sectonema				*
Thornenematinae				*
Pungentus				*
Mononchidae totaal				*
Dorylaimidae totaal				*

**Bijlage 3. Significante correlaties tussen het aantal Mononchida en Dorylaimida en de gemeten bodem-parameters.**

	<b>Parameter</b>	<b>Mononchidae</b>	<b>Dorylaimidae</b>
Algemeen	Zand		
	Jaar bemonstering		0.2(0.023)127
	Voor- of najaar		-0.2(0.026)127
Fysisch	Lutum		
Chemisch	OS		0.44(0.001)127
	C totaal		0.40(0.001)68
	HWC		-0.52(0.031)17
Biologisch	Potentiele N mineralisatie		0.42(0.001)59
	Potentieel mineraliseerbare N		0.57(0.001)65
	Nematoden totaal		0.59(0.001)127
	CP1		0.42(0.001)100
	CP2		0.57(0.001)100
	CP4		0.80(0.001)100
	CP5		0.71(0.001)100
	MI2-5		0.45(0.001)127
	Clarkus M3	0.57(0.001)127	
	Mylonchulus M1	0.43(0.001)127	
	Aporcelaimellus D2		0.44(0.001)127
	Dorylaimoidae D0		0.74(0.001)127

	<b>Parameter</b>	<b>Mononchidae</b>	<b>Dorylaimidae</b>
Algemeen	Klei		
	Jaar bemonstering	0.22(0.048)78	-0.28(0.015)78
	Voor- of najaar		0.77(0.001)78
Fysisch	Lutum		-0.70(0.001)78
Chemisch	P totaal		-0.71(0.001)64
	pH		0.60(0.001)78
	OS		-0.69(0.001)78
	C totaal		-0.56(0.001)62
	N totaal		-0.70(0.001)78
	C/N		0.81(0.001)78
Biologisch	Schimmel biomassa	0.44(0.001)78	
	Potentiele N mineralisatie		-0.69(0.001)78
	Potentieel mineraliseerbare N	0.44(0.003)46	
	CO2	-0.53(0.001)48	-0.56(0.001)48
	CP3		0.68(0.001)78
	CP4	0.58(0.001)78	0.80(0.001)78
	CP5		0.87(0.001)78
	MI1-5	0.55(0.001)78	0.66(0.001)78
	MI1-d	0.57(0.001)78	0.64(0.001)78
	MI2-5	0.48(0.001)78	0.77(0.001)78
	Anatonchus M4	0.46(0.001)78	
	Clarkus M3	0.45(0.001)78	
	Mononchidae M2	0.47(0.001)78	0.49(0.001)78
	Mylonchulus M1		0.46(0.001)78
	Aporcelaimellus D2		0.80(0.001)78
	Dorylaimoidae D0		0.88(0.001)78
Ecumenicus D1		0.55(0.001)78	
Eudorylaimus D3		0.47(0.001)78	

## Bijlage 4. Roofaaltjes Expresse.



### Aantal roofaaltjes geeft inzicht in bodemvruchtbaarheid

De bodem is een samenspel van biologische, fysieke en chemische factoren. De eerste gedachte van telers bij bodembioïologie gaat vaak in de richting van organismen die schadelijk zijn voor het gewas of het oogsbare product. De bodem bevat echter ook nuttige organismen die er voor zorgen dat alle processen in de bodem goed blijven functioneren.

Bacteriën zorgen voor mineralisatie en met behulp van schimmels kan een plant fosfaat opnemen. Zo zijn er ook nematoden die niet schadelijk zijn voor gewassen. Gelukkig is het aantal niet-schadelijke nematoden veel groter dan het aantal schadelijke nematoden. Zelfs als de besmetting met schadelijke aaltjes in een perceel heel groot is.

De dynamiek van het leven onder de grond (bodembioïologie) is vergelijkbaar met het leven boven de grond. Zo is het aantal leeuwen in Afrika afhankelijk van het aantal antilopen; het aantal antilopen is afhankelijk van de hoeveelheid vers (éwütijk) gras. Als het gras slecht groeit, daalt het aantal antilopen en neemt uiteindelijk het

aantal leeuwen af. Het aantal leeuwen zegt dus iets over het voedselweb op de prairie of steppe.

Onder de grond is eenzelfde vergelijking te maken. Als het aantal roofaaltjes (analoog met leeuwen) gering is, dan is het voedselweb in de bodem niet optimaal. Daarom analyseert BLCG AgroXpertus als eerste de roofaaltjes. De aanwezigheid van roofaaltjes geeft inzicht in de kwaliteit en vitaliteit van het voedselweb in de bodem en daarmee van de bodemvruchtbaarheid.

De analyse van roofaaltjes verricht BLCG AgroXpertus met behulp van de meest moderne DNA-technieken. Hierdoor kan de analyse van roofaaltjes in hetzelfde monster plaatsvinden als de analyse van plantparasitaire aaltjes. Op het verslag worden twee hoofdgroepen vermeld: 'Monomithella' en 'Dorylaimida'. Monomithella zijn aaltjes met een grote mondholte en één of meerdere tanden. Zij verslinden hun prooi. Dorylaimida zijn aaltjes met een spoer. Zij prikken hun prooi aan en zuigen hem leeg.

Rendement	Grip	Gemak
Dankzij moderne DNA-technieken is BLCG AgroXpertus in staat roofaaltjes in hetzelfde monster te analyseren als plantparasitaire aaltjes. Iegen geringe meerkosten krijgt u bruikbare aanvullende informatie.	Roofaaltjes zijn een indicator voor de vitaliteit van het bodemvoedselweb. Zo krijgt u meer grip op de biologische processen in de bodem.	Gemakkelijk op aanvraag beschikbaar via de buitendienst van BLCG AgroXpertus.



BLCG AGROXPERTUS



## Bijlage 4. Vervolg

### Bodemvoedselweb

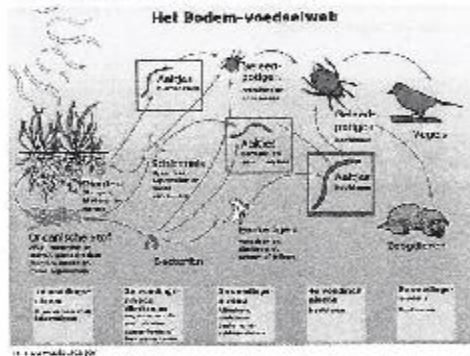
Alle levende organismen in de bodem vormen samen 'het bodemleven'. Het ingewikkelde patroon van 'eten en gegeten worden' wordt 'bodemvoedselweb' genoemd. Elke soort heeft hierin zijn eigen plaats. Aaltjes zijn op verschillende plaatsen in het bodemvoedselweb aanwezig. Plantparasitaire aaltjes tasten planten aan. Schimmel-etende aaltjes voeden zich op schimmeldraden. Bacterie-etters voeden zich met bacteriën. Roofaaltjes voeden zich met bodemdierpjes, waaronder plantparasitaire aaltjes. Roofaaltjes zijn dus nuttig in de beheersing van een aaltjcsbesmetting.

Gezien het ingewikkelde patroon van het bodemvoedselweb is het onmogelijk om alle soorten afzonderlijk te onderzoeken. Het is dus noodzakelijk om de aandacht te richten op groepen die een specifieke rol in de bodem vervullen. Roofaaltjes vervullen zo'n specifieke rol.

Roofaaltjes zijn een goede indicator voor de kwaliteit van het bodemvoedselweb en daarmee van de bodemvruchtbaarheid. Geen of weinig roofaaltjes betekent dat schadelijke aaltjes en andere bodemorganismen vrij spel hebben. Hierdoor kan ook de mineralisatie stagneren. Daarnaast zijn roofaaltjes gevoelig voor stress. Een perceel dat bijvoorbeeld tijdens de oogst 'ruw' is behandeld, zal een lager aantal roofaaltjes bevatten dan grond die met 'liefdie' wordt behandeld.

Bij lage aantallen roofaaltjes kunnen telers / adviseurs zich de volgende vragen stellen:

- Is zorgvuldig met de bodem omgesprongen?
- Is er geoogst bij nat weer?
- Is er geploegd onder natte omstandigheden?
- Is het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen niet te ruim?
- Is het organische stof percentage op peil?
- Is de structuur van de bodem op maat?



### Roofaaltjes zijn indicator van stabiliteit

"Roofaaltjes zeggen iets over de stabiliteit van de voedselvoorziening van het bodemvoedselweb. Is er een continue aanvoer van voldoende en goed voedsel? Bij sterke verstoringen of fluctuaties zal het aantal roofaaltjes dalen."

Aan het woord is dr. Nick van Eekeren, Senior Onderzoeker Agro-biodiversiteit en Duurzame Voerproductie bij het Louis Bolk Instituut in Driebergen. Van Eekeren onderzoekt voor zijn promotie op grasland (landgrasland) het effect van managementmaatregelen op het bodemleven en ecosysteemdiensten. Daarbij keek hij ook naar roofaaltjes. Zijn conclusie: "Roofaaltjes geven informatie over de stabiliteit van het bodemsysteem en minder over de bodemvruchtbaarheid. In bijvoorbeeld grasland zie je veel roofaaltjes, maar op een perceel met continu snijmaai ook. Op het moment dat je de ploeg in het grasland zet, daalt het aantal roofaaltjes drastisch. Hetzelfde zie je echter als een perceel continu snijmaai wordt omgevormd naar grasland."

Het zijn vooral veranderingen in het voedselaanbod die maken dat het aantal roofaaltjes fluctueert. Tegem die achtergrond is het redelijkerwijs aan te nemen dat niet-kanende-grondbewerking het aantal roofaaltjes doet groeien. "Die verstoring is minder dan bij ploegen en het aanbod van voedsel in de bovenste laag is groter. Dat zijn inderdaad factoren die gunstig zijn voor roofaaltjes."

**BLGG AgroExpertus**  
 Smethlaan 5  
 Postbus 170  
 6700 AH Wageningen  
 Telefoon: +31 (0)30 876 1010  
 Fax: +31 (0)84 - 8761011  
 E-mail: klantenservice@blggagroexpertus.com  
 Internet: blggagroexpertus.nl