



WAGENINGEN UR

For quality of life

wetenschapswinkel



EM: Effectieve microben of effectieve magie?

Een onderzoek naar de effectiviteit
van Effectieve Micro-organismen (EM)

Prof. Dr. Ariena van Bruggen
Dr. Wim Blok
Ing. Oscar de Vos
Dine Volker
Geert van Diepen

Maart 2008

Rapport 245

EM: Effectieve microben of effectieve magie?

Een onderzoek naar de effectiviteit van
Effectieve Micro-organismen (EM)

Prof. Dr. Ariena van Bruggen

Dr. Wim Blok

Ing. Oscar de Vos

Dine Volker

Geert van Diepen

Wageningen Universiteit en Researchcentrum

Wetenschapswinkel Wageningen UR
Maart 2008

Rapport 245

Colofon

EM: Effectieve microben of effectieve magie?

Een onderzoek naar de effectiviteit van Effectieve Micro-organismen (EM)

Auteurs:

Prof. Dr. Ariena van Bruggen¹

Dr. Wim Blok¹

Ing. Oscar de Vos¹,

Dine Volker¹,

Geert van Diepen

¹ Leerstoelgroep Biologische Landbouwsystemen

Projectleiding:

Hugo Hoofwijk, De Groene Link

Wetenschapswinkel Wageningen UR, rapportnummer 245

Maart 2008

ISBN: 90-8585-087-8

Foto's omslag: Heleen Smeyers

Foto's binnenwerk: Geert van Diepen, Greet Tijskens

Druk: Grafisch Service Centrum Van Gils B.V., Wageningen

Lay-out: Hildebrand DTP, Wageningen

www.wetenschapswinkel.wur.nl

EM: Effectieve microben of effectieve magie?

Een onderzoek naar de effectiviteit van
Effectieve Micro-organismen (EM)

Rapportnummer 245

Prof. Dr. Ariena van Bruggen, Dr. Wim Blok, Ing. Oscar de Vos, Dine Volker, Geert van Diepen,
Wageningen, maart 2008

Velt vzw

eco voor doe-het-zelvers
Uitbreidingstraat 392c
2600 Berchem
België
info@velt.be
03 281 74 75
Vlaanderen: www.velt.be
Nederland www.velt-nederland.nl

Gezond leven op het ritme van de seizoenen, met respect voor de natuur. Dat is ecologisch leven in een notendop. Velt geeft deze idee concreet gestalte in keuken, tuin en daarbuiten en helpt jou om een ecologische levensstijl te ontwikkelen, met kwaliteitsvolle publicaties, cursussen en campagnes.

Zelf gezonde groenten kweken, zonder pesticiden en scheikundige bemesting? Preventieve bescherming van je groenten en compost zorgen daarvoor. Jij proeft het verschil en het milieu vaart er wel bij. Velt telt 12000 leden in Vlaanderen en Nederland en 100 lokale afdelingen.

Leerstoelgroep Biologische Landbouwsystemen

Marijkeweg 22
6709 PG Wageningen
www.bfs.wur.nl
Prof. Dr. Ir. A.H.C. van Bruggen
ariena.vanbruggen@wur.nl

De leerstoelgroep Biologische Landbouwsystemen richt zich op het ontwikkelen en verspreiden van nieuwe wetenschappelijke kennis om biologische landbouwsystemen te analyseren, te ontwerpen en te evalueren. Hierbij worden natuurlijke ecologische processen zo maximaal mogelijk gebruikt. Onderzoek is toegespitst op biologische en geïntegreerde productiesystemen. De leerstoelgroep is gespecialiseerd in plantaardige productiesystemen, maar waar mogelijk wordt samengewerkt met dierlijke productiesystemen.

De Groene Link

kennisbemiddeling in de groene ruimte
August Faliseweg 9
6703 AP Wageningen
06 - 19 93 47 03
www.groenelink.nl
hugo.hoofwijk@groenelink.nl

Wetenschappelijke kennis toegankelijk maken voor de praktijk, dat is de missie van De Groene Link. En andersom natuurlijk: ervaringskennis uit de praktijk ontsluiten voor wetenschappers. Projectmanagement is de andere hoofdactiviteit van De Groene Link. Zowel de kennisbemiddeling als het projectmanagement zijn voornamelijk gericht op de groene ruimte.

Wetenschapswinkel Wageningen UR

Postbus 9101
6700 HB Wageningen
0317 48 39 08
wetenschapswinkel@wur.nl
www.wetenschapswinkel.wur.nl
www.wetenschapswinkels.nl

Maatschappelijke organisaties zoals verenigingen en belangengroepen, die niet over voldoende financiële middelen beschikken, kunnen met onderzoeksvragen terecht bij de Wetenschapswinkel Wageningen UR. Deze biedt ondersteuning bij de realisatie van onderzoeksprojecten. Aanvragen moeten aansluiten bij de werkgebieden van Wageningen UR: duurzame landbouw, voeding en gezondheid, een leefbare groene ruimte en maatschappelijke veranderingsprocessen.

Begeleidingscommissie

Barbara Hoekstra
Cel Thuiscomposter, VLACO vzw

Koen Willekens
TAD FarmCOMPOST, ILVO

Dirk Reheul
Vakgroep Plantaardige Productie,
Faculteit bio-ingenieurswetenschappen UGent

Samenvatting.....	vii
Abstract	viii
Verklarende woordenlijst	ix
1 Aanleiding en uitgangspunten	1
1.1 Korte schets van de aanvragende organisatie.....	1
1.2 Aanleiding tot het verzoek om onderzoek	1
2 De onderzoeksvraag.....	3
2.1 Afbakening.....	3
2.2 De twee onderzoeksvragen	3
2.2.1 Compost	3
2.2.2 Ziekteverende bodem	3
3 Het effect van het gebruik van EM-oplossing tijdens het composteren op het verloop van het composteerproces en op de kwaliteit van de geproduceerde compost in termen van stabiliteit en nutriënten-samenstelling	5
3.1 Inleiding	5
3.2 Materiaal en Methoden.....	5
3.2.1 Opstelling van de composthopen.....	5
3.2.2 Metingen tijdens het composteren	8
3.2.2.1 Temperatuur	8
3.2.2.2 CO ₂	8
3.2.3 Bepalingen aan de uiteindelijke compost	8
3.2.4 Statistische analyses	8
3.3 Resultaten.....	8
3.3.1 Temperatuur	8
3.3.2 CO ₂	9
3.3.3 Chemische analyses.....	10
3.3.4 Compost stabiliteit	10
3.4 Conclusies	11
4 Het effect van de toepassing van EM-bokashi op de ziekteverendheid van de bodem	13
4.1 Inleiding	13
4.1.1 Achtergrond	13
4.1.2 Ziekteonderdrukkende gronden	13
4.1.3 Microbiële inocula; gebruik en beperkingen	14
4.1.3.1 Wisselwerkingen van microbiële inocula met het bodemleven en planten	14
4.1.3.2 Het gebruik van microbiële inocula voor de onderdrukking van plantenziekteverwekkers	14
4.1.3.3 Beperkingen en uitdagingen voor microbiële inocula	15
4.1.4 Bestanddelen EM	16
4.1.5 EM producten	16
4.1.6 Eerder EM onderzoek	17
4.1.7 Doelstellingen	18
4.2 Materiaal & methoden.....	18
4.2.1 Algemene methodologie	18
4.2.2 Besmettingsniveaus van natuurlijk voorkomende pathogenen	19
4.2.3 Effecten van EM op de gezonde gronden	19
4.2.3.1 Pythium biotoets	19
4.2.3.2 Rhizoctonia biotoets.....	20
4.2.4 Effecten van EM op de zieke gronden	21
4.2.5 Karakterisering van de grond	21
4.2.6 Myceliumgroeitest	21
4.2.7 Ademhalingstest	22
4.2.8 Bacteriële soortensamenstellingstest.....	23

4.3	Resultaten.....	25
4.3.1	Besmettingsniveaus van natuurlijk voorkomende pathogenen.....	25
4.3.2	Gezonde gronden met EM.....	25
4.3.2.1	Pythium biotoets	25
4.3.3	Zieke gronden met EM.....	27
4.3.4	Myceliumgroeitest.....	28
4.3.5	Ademhalingstest.....	29
4.3.6	Bacteriële soortensamenstellingstest.....	30
4.4	Conclusies	32
5.	Algemene discussie.....	33
5.1.	Compostering in het veld	33
5.2.	Bokashi productie in het lab.....	33
5.3.	Ziekten- en pathogenenonderdrukking	33
5.4.	Grondanalyses	34
6.	Algemene conclusies en aanbevelingen.....	37
7.	Literatuur.....	39
	Bijlage 1. Specificaties van de gebruikte gronden	42

Samenvatting

In dit onderzoek werden de effecten bepaald van het microbiële middel EM (Effectieve Micro-organismen) op het verloop van het compostingsproces en op de ziekteverendheid tegen wortelziekten. EM zou 80 soorten micro-organismen bevatten, die tot verschillende groepen bacteriën, schimmels, gisten en actinomyceten behoren. EM-A van producent Agriton werd al dan niet aan een mengsel van houtsnippers, snoeihout en grasmaaisel toegevoegd. Het compostingsproces in open bakken werd gevolgd door meting van temperatuur en CO₂ emissie. Er werden geen duidelijke verschillen gevonden in het composteerproces, noch in de samenstelling van de uiteindelijke compost. De temperatuur tijdens het composteren werd licht verhoogd door toevoeging van EM.

EM werd ook toegevoegd aan biologisch beteelde gronden in de vorm van gefermenteerd organisch materiaal (bokashi). Verschillende experimenten en bodemanalyses werden gedaan om te bepalen welk effect EM zou hebben op de ziekteverendheid van de bodems. Drie behandelingen werden gebruikt: EM bokashi, gesteriliseerde bokashi (om het effect van toevoeging van organisch materiaal te testen), en een controle. Voor de eerste biotoetsen werd een pathogeen toegevoegd, en een specifieke ziektegevoelige testplant gezaaid. Een experiment met *Pythium ultimum* en komkommer liet geen ziekteverendheid door EM zien. De toevoeging van beide bokashi behandelingen gaf zelfs een hoger aantal aangetaste planten. Een biotoets met wortel gaf voor één van de gebruikte gronden een duidelijk lagere aantasting door *Rhizoctonia solani* in de EM behandelde grond dan in de grond met gesteriliseerde bokashi en die zonder toevoeging. Ook zijn er biotoetsen gedaan met door ziekte besmette gronden. Deze experimenten lieten geen effect van EM zien. Een mycelium groeitoets werd gedaan om de onderdrukkende effecten van EM op schimmelgroei te bepalen. In de resultaten waren alleen kleine verschillen zichtbaar, maar deze wijzen er niet op dat EM een schimmelonderdrukkend effect had. Daarnaast zijn er bodemanalyses gedaan om te bepalen hoe EM de bodemmicrobiologie zou beïnvloeden. Een bodemrespiratie analyse werd gedaan om te bepalen of EM een verandering brengt in de totale bodem microflora populatie. In de bokashi behandelingen werd een hogere CO₂ productie waargenomen, maar er was geen verschil tussen de EM en gesteriliseerde bokashi. Dit duidt erop dat EM geen invloed heeft op de totale hoeveelheid micro-organismen, hoewel EM een deel van de oorspronkelijke microflora kan hebben vervangen. Een DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analyse werd uitgevoerd of EM invloed heeft op de specifieke bacteriepopulaties van de grond. Er werden geen verschillen waargenomen tussen de verschillende grondbehandelingen. Mogelijk is de EM na toevoeging meteen weggeconcentreerd en heeft daardoor geen invloed gehad op de bacteriepopulatie. Geconcludeerd kan worden dat EM de algemene ziekteverendheid van de bodem niet verbetert, maar in bepaalde gevallen een goede invloed kan hebben op de specifieke ziekteverendheid van de grond.

In het algemeen kan geconcludeerd worden dat de samenstelling en effecten van EM sterk kunnen variëren en dat gebruik eerst op kleine schaal getest dient te worden alvorens tot grootschalig gebruik over te gaan.

Abstract

In this research the effects of the microbial inoculant EM (Effective Microorganisms) were determined on the composting process and suppression of root diseases. EM is said to contain 80 species of effective micro-organisms, belonging to different groups of bacteria, fungi, yeasts and actinomycetes. EM-A produced by the company Agriton was added to a mixture of wood chips, prunings and grass clippings. Control piles did not receive EM-A. The composting process in open containers was monitored by measuring the internal temperature and CO₂ emission. No clear differences were found in the composting process or the composition of the final compost. The temperature was slightly increased during composting after addition of EM.

EM was also added to organically managed soils in the form of fermented organic matter (bokashi). Different experiments and soil analyses were carried out to determine if EM would affect the disease suppression of soils. Three different treatments were used: EM bokashi, sterilized bokashi (to test the effect of addition of organic matter) and a control. In the first bio-assays, soil mixes were infested with a pathogen, and a specific host plant was sown. An experiment with *Pythium ultimum* and cucumber did not result in a disease suppressive effect by EM. In fact, the addition of both bokashi treatments gave lower disease suppression; more plants were infected in these treatments. In one of three soils, infection of carrot by *Rhizoctonia solani* was reduced by EM compared to the sterilized bokashi and control treatments. Bio-assays were also done with naturally infested soils, but no effect of EM on disease severity was observed. A mycelium growth test was done to determine inhibitory effects of EM on fungal growth. There was no indication that EM had a suppressive effect on the fungi tested. Additional soil analyses were done to determine effects of EM on soil microbiology. A soil respiration analysis was carried out to determine if EM changes the total soil microbial activity. A higher CO₂ production was observed for the bokashi treatments, but there were no differences between the EM bokashi and the sterile bokashi. This indicates that EM does not change the total microbial activity, although the EM could have replaced part of the indigenous microflora. A DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysis was performed to determine if soil amendment with EM changes the bacterial community in the soil. No differences were observed between the different soil treatments. The added microorganisms in EM were possibly immediately outcompeted and did not affect the existing bacterial community. It can be concluded that EM does not improve the general disease suppression of soils, but EM may improve the specific disease suppression in some soils.

In general, the composition and effects of EM can vary significantly. It is therefore advisable to test the use of EM first on a small scale before applying any EM on a larger scale.

Verklarende woordenlijst

Anaeroob	In afwezigheid van zuurstof
Antagonisme	Remming van de groei of activiteit van een pathogeen door een (groep van) micro-organisme(n) door concurrentie om voedingsstoffen en water of door productie van antibiotica
Aeroob	In aanwezigheid van zuurstof
Biocide	Organisme dodende stof
Biomassa	Drooggewicht van organismen van dierlijke of plantaardige oorsprong
Biostase	De rusttoestand waarin een micro-organisme zich bevindt zodat het in staat is om veranderende milieu-omstandigheden te doorstaan zonder zich hiervoor actief te moeten aanpassen; die toestand kan meestal doorbroken worden door toediening van voedingsstoffen
Bokashi	Japans voor “gefermenteerde organische stof”
Bulkgrond	Grond buiten de rhizosfeer; onbewortelde grond
EM	Effectieve Micro-organismen
EM1	Vloeibaar product met in rustfase verkerende EM. Uitgangsmateriaal voor de productie van EM-A
EM-A	Vloeibaar product met actieve EM, dat direct op de grond of plant kan worden gespreid of kan worden aangewend voor de productie van EM-Bokashi
EM-bokashi	Gefermenteerd mengsel van organisch materiaal en EM, eventueel verrijkt met kleimineralen en kalk
Fermentatie	Vergisting; het omzetten van organische materialen met behulp van (een soortenmengsel van) micro-organismen in afwezigheid van zuurstof
Microbieel inoculum	Microbiële vaste of vloeibare entstof, bestaande uit één enkele soort of meerdere soorten micro-organismen
Mycelium	Netwerk van alle draden van een schimmel. Het mycelium wordt ook wel zwamvlok genoemd
Parasitisme	Het samenleven van twee micro-organismen, waarbij de samenleving voor één van de micro-organismen schadelijk is
Pathogeen	Ziekteverwekker
Rhizosfeer	De directe nabijheid – niet verder dan 1.5 mm – van de plantenwortel



1 Aanleiding en uitgangspunten

1.1 Korte schets van de aanvragende organisatie

Velt, Vereniging voor Ecologische Leef- en Teeltwijzen, is een Vlaams-Nederlandse vereniging die mensen wil informeren over verantwoorde en bruikbare ecologische alternatieven. Velt ontwikkelt daartoe nieuwe kennis en draagt deze kennis uit in publicaties, het tijdschrift Seizoenen en middels activiteiten van de afdelingen. Velt telt ongeveer 12500 leden (gezinnen). Zij kunnen rekenen op advies en dienstverlening van de stafmedewerkers op het secretariaat van Velt. Bovendien organiseren de honderd afdelingen van Velt plaatselijk heel wat activiteiten. Een belangrijk onderdeel van de dienstverlening aan leden is de publicatie van Seizoenen, het tijdschrift van Velt. Daarin zitten vaste rubrieken over voeding, de ecologische moes- en siertuin, groene consumentennieuwtjes en het milieubeleid. Voorts is Velt's Handboek Ecologisch Tuinieren een standaardwerk, niet alleen in België maar ook in Nederland.

1.2 Aanleiding tot het verzoek om onderzoek

Regelmatig worden de leden van Velt geconfronteerd met handelaars die producten aanbieden op basis van de EM (effectieve micro-organismen)-technologie. De EM-technologie is ontwikkeld door de Japanse professor Higa. EM bestaat uit 'een mengsel van bacterie- en schimmelculturen van nuttige en in de natuur voorkomende micro-organismen'. Het veronderstelde werkingsgebied in de land- en tuinbouw is zeer breed o.a. bodemvruchtbaarheidsverbetering, bladbemesting, versnelde compostering, en verbetering van het ziekteverend vermogen van de bodem. Naast gebruik in de landbouw kan EM ook toegepast worden in het huishouden (bijvoorbeeld reinigingsmiddel tegen schimmels) en de lichaamsverzorging (bijvoorbeeld curatieve drankjes).

Een aantal leden van Velt past EM reeds toe in de tuin (om de bodem te behandelen, gewassen te beschermen, kruiden te drogen), in het huis en in hun voeding. Die leden van Velt stellen de tuinmedewerkers en -lesgevers dan ook regelmatig de vraag of Velt een standpunt kan innemen ten aanzien van EM. Velt kan dit tot op heden niet doen omdat ze niet over voldoende goede onderzoeksresultaten beschikt, en wel omdat:

1. het onderzoek dat tot nu toe gedaan is, over het algemeen van twijfelachtig wetenschappelijk gehalte is.
2. het onderzoek dat gedaan is zich niet richtte op de twee claims die voor Velt-leden het meest interessant zijn: het vergroten van het ziekteverend vermogen van de bodem en het verbeteren van compostkwaliteit.
3. het onderzoek dat heeft plaatsgevonden zich richtte op de gangbare landbouw, en niet op de ecologische moestuin. Juist bij een preparaat dat haar veronderstelde werking dankt aan bacteriële activiteit is dit van belang, zo heeft bijvoorbeeld de bodem in een ecologische moestuin in het algemeen een rijkere bodemleven waardoor de werking van EM hier anders zou kunnen uitvallen dan in de reguliere tuinbouw.



2 De onderzoeksvraag

2.1 Afbakening

Het door de promotoren van EM geclaimde werkingsgebied van EM is groot. Ook binnen de land- en tuinbouw is de claim breed. Het spreekt voor zich dat, om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te kunnen genereren, we ons moesten beperken tot enkele deelaspecten. Simultaan speelde mee dat de vraag van Velt zich specifiek richtte op de *ecologische* moestuin. Zoals hierboven reeds aangegeven was dit gegeven mede sturend voor de afbakening van het onderzoek.

2.2 De twee onderzoeksvragen

Deze twee zaken overwegende is gekozen voor een afbakening tot twee van de claims.

2.2.1 Compost

Uitvinder en importeur claimen:

“Wanneer bij de bereiding van compost EM-oplossing wordt gebruikt loopt de temperatuur tijdens composteren minder hoog op. Daardoor gaat minder energie uit de organische stof verloren. EM compost behoudt 50% meer energetische voedingswaarde dan traditionele compost”. De term ‘energetische voedingswaarde’ is niet wetenschappelijk; we zijn er daarom van uitgegaan dat het hier gaat om C (koolstof), en de mate waarin dit C stabiel is. Wanneer we praten over de kwaliteit van compost is niet alleen de stabiliteit van het C-complex van belang, maar ook de nutriëntensamenstelling – hierbij gaat het met name om N, P en K (stikstof, fosfaat en kali).

De volgende onderzoeksvraag werd geformuleerd:

Welk effect heeft het gebruik van EM-oplossing tijdens het composteren op het verloop van het composteerproces en op de kwaliteit van de geproduceerde compost in termen van stabiliteit en nutriëntensamenstelling?

Om deze vraag te beantwoorden, werd een composteerexperiment uitgevoerd in het containerpark in Herselt, België. Onder leiding van Ann Walraevens, de duurzaamheidsambtenaar van de gemeente Herselt, zorgden de compostmeesters van Herselt voor de compostering en voor de metingen in het veld. De verwerking van de verkregen gegevens en de monsters die na afloop van de compost genomen zijn gebeurde in Wageningen bij de leerstoelgroep Biologische Landbouwsystemen. De gehele leiding had Wim Blok en dit werd vanaf juli 2007 overgenomen door Dine Volker.

2.2.2 Ziektewerende bodem

Uitvinder en importeur claimen:

“De micro-organismen uit EM vestigen zich in de bodem, vermeerderen zich en gaan domineren over de aanwezige schadelijke organismen. Neutrale micro-organismen sluiten zich niet langer aan bij de tot dan toe overheersende schadelijke organismen maar bij de nuttige EM organismen. Een ziekteverwekkende bodem wordt bijgevolg ziektewerend.” Ook hier geldt dat de redenering niet geheel past binnen het gangbare wetenschappelijke denken. Het eindresultaat echter, een meer of minder ziektewerende bodem, is wel degelijk middels gangbare wetenschappelijke methoden te onderzoeken.

De volgende onderzoeksvraag werd geformuleerd:

Welk effect heeft de toepassing van EM-bokashi op de ziektewerendheid van de bodem?

Om deze vraag te beantwoorden, werden een aantal experimenten uitgevoerd in de kas en klimaatcellen van Wageningen Universiteit door MSc student Geert van Diepen onder leiding van Dr. Wim Blok en Prof. Dr. Ariena van Bruggen van de leerstoelgroep Biologische Landbouwsystemen. Het MSc verslag werd door Geert in het Engels geschreven en naar het Nederlands vertaald door Ing. Oscar de Vos. Prof. Dr. Ariena van Bruggen was eindredacteur van het verslag.



3 Het effect van het gebruik van EM-oplossing tijdens het composteren op het verloop van het composteerproces en op de kwaliteit van de geproduceerde compost in termen van stabiliteit en nutriënten-samenstelling

3.1 Inleiding

Er is niet veel informatie in de wetenschappelijke literatuur over het effect van EM op het composteeringsproces. Het effect van EM op de compostering van dennenbastmateriaal samen met geitenmest of rioolslib werd gevolgd voor een periode van 90 dagen. De temperatuur, pH en de elektrische geleiding veranderden tijdens het composteeringsproces, maar werden niet beïnvloed door EM toevoeging. Ook de uiteindelijke chemische samenstellingen van de composten werden niet beïnvloed door de toevoeging van EM (Mupondi et al., 2006).

Het effect van EM toevoeging op de afbraak van bananenplantenmateriaal werd onderzocht in Costa Rica (Formowitz et al., 2007). Toevoeging van EM in melasse en gesteriliseerde EM aan het te composteren bananenmateriaal (bokashi) werd vergeleken met bananenmateriaal gecomposteerd met water. Het effect van EM op de afbraaksnelheid van het bananenmateriaal was verwaarloosbaar klein. Toch was de schimmelmassa in EM bokashi groter dan in bokashi gemaakt met gesteriliseerde EM, terwijl de totale microbiële biomassa juist lager was in de EM bokashi. Er was geen effect van EM op de groei van bananenplanten in grond waaraan bokashi was toegevoegd.

Hoewel geen effect van EM op de temperatuur tijdens het composteren gevonden werd (Mupondi et al., 2006), claimt de producent van EM dat bij gebruik van EM tijdens het composteren, de compostering bij een lagere temperatuur verloopt. Als gevolg hiervan zou de kwaliteit van de compost afkomstig van de composthoopen met EM-toevoeging beter zijn.

De leden van Velt vroegen zich af of dit waar zou zijn voor compostering op kleine schaal. Naar aanleiding hiervan werd de volgende onderzoeksvraag geformuleerd:

Welk effect heeft het gebruik van EM-oplossing tijdens het composteren op het verloop van het composteerproces en op de kwaliteit van de geproduceerde compost in termen van stabiliteit en nutriëntensamenstelling? Deze onderzoeksvraag werd beantwoord in het hieronder beschreven experiment.

3.2 Materiaal en Methoden

3.2.1 Opstelling van de composthoopen

Op 25 mei 2007, werden 10 compostbakken aan de noordrand van het containerpark in Herselt geplaatst, in twee groepen van vijf. De bakken waren van het merk ECOL, type Mono 120/S, en hadden een lengte, breedte en hoogte van 120 cm x 120 cm x 100 cm, en een inhoud van 1080 liter per bak. De bakken hadden aan alle zijden luchtspleten voor de doorluchting (Fig. 1).



Fig. 1. De opstelling van twee groepen compostbakken in Herselt, mei 2007.

De composthoop werden opgebouwd met het volgende uitgangsmateriaal:

1. Houtsnippers afkomstig van gehakseld snoeihout (36,4 %)
2. Fijn snoeihout (27,3 %)
3. Grasmaaisel (36,4 %)

Deze percentages zijn op volume basis.

Het mengen gebeurde op een betonplaat (Fig. 2). De materialen werden in de hierna genoemde volgorde toegevoegd en daarna omgeschept:

1. een laag fijn snoeihout (30 kruiwagens)
2. een laag gras (30 kruiwagens)
3. een laag houtsnippers (30 kruiwagens)
4. een laagje gras (10 kruiwagens)
5. een laagje houtsnippers (10 kruiwagens)



Fig. 2. Het mengen van te composteren materiaal in Herselt, mei 2007.

Aan iedere compostbak werden in totaal 16 kruiwagens te composteren materiaal toegevoegd. Eerst werden drie controle compostbakken gevuld: C1, C2 en C3. Aan deze bakken werd met een gieter 1800 ml water (zonder EM-A) om en om met het materiaal toegevoegd.

Vervolgens werd het EM-A mengsel gemaakt, met 1 liter EM-A + 10 liter water, volgens het advies van Agriton (de Nederlandse EM-vertegenwoordiger). Voor de drie composthopen werd in totaal 5400 ml EM-A oplossing gemaakt. Dus 1800 ml per bak. Daarna werden de compostbakken voor de EM toepassing gevuld. Ook hier werd steeds om en om een laag materiaal ingebracht en dan een gieter met EM-A oplossing toegevoegd. Deze composthopen worden verder als EM1, EM2 en EM3 aangeduid (Fig. 3).

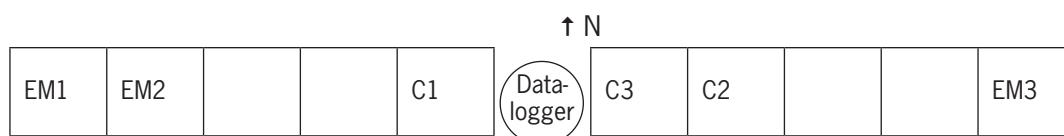


Fig. 3. Opstelling van de composthopen na het inzetten.

Uiteindelijk werden per composthoop vier thermokoppels ingebracht om het temperatuurverloop te meten. De thermokoppels waren aan stokjes bevestigd waarmee ze tot op een diepte van 40 cm in de composthopen gestoken konden worden. Per composthoop werd er één van bovenaf in het centrum gestoken en drie van opzij op verschillende plaatsen, één halverwege de bovenkant en midden-hoog (de helft van de totale hoogte), één midden-hoog, en één halverwege midden-hoog en de onderkant. Buiten de composthopen werden aan een stok twee thermokoppels op een hoogte van ongeveer 80 cm aangebracht voor het meten van de buitentemperatuur.

Uiteindelijk heeft iedere hoop nog een gieter water gehad (10 liter) en is daarna afgedekt met plastic.

Op 21 juni en 26 juli werden de composthopen omgezet. De thermokoppels werden eerst verwijderd. Daarna werden de hopen omgescheept naar een lege bak er naast. Hierbij werd steeds goed opgelet dat de controles niet in een bak terecht kwamen waarin een EM-composthoop had gezeten en omgekeerd (Fig. 4).

De composthopen waren aan de droge kant en daarom is water toegevoegd. Een vak werd met de helft van de compost gevuld dan een gieter water over het materiaal en de rest van het materiaal erop en nog twee gieters water. De thermokoppels werden weer in dezelfde verdeling ingebracht. Er werd geen plastic meer over de hopen gedaan, omdat het eventuele uitdrogen dan beter in de gaten gehouden kon worden en er van tijd tot tijd regen bij kon.

Op 27 september werden de composthopen afgebroken en werden monsters van de compost verzameld voor chemische analyses.

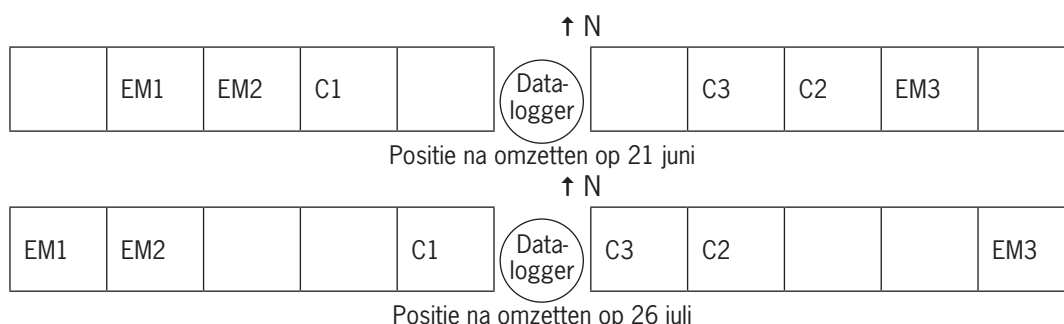


Fig. 4. Opstelling van de composthopen na het omzetten.

3.2.2 Metingen tijdens het composteren

3.2.2.1 Temperatuur

De temperatuur werd om het uur gemeten en vastgelegd in een datalogger. Deze werd regelmatig uitgelezen mbv. een laptop. Een paar maal zijn er metingen uitgevallen doordat een thermokoppel kapot ging of doordat er problemen met de data-taker waren. Maar dit bleek geen grote problemen te geven voor de uiteindelijke resultaten.

3.2.2.2 CO₂

Het volume percentage CO₂ werd gemeten mbv. een eenvoudige CO₂ meter van Soiltech Solutions. Er werd gemeten in het centrum van de hoop. Dit is een vrij grove meting die ook bij compostbedrijven wordt toegepast om een indicatie van de CO₂ productie te krijgen. Het voordeel is dat hij makkelijk uit te voeren is. Er werd door de compostmeesters om de drie á vier dagen gemeten. En later toen er minder activiteit in de hopen was met grotere tussenposen.

3.2.3 Bepalingen aan de uiteindelijke compost

Bij het afbreken van de hopen werd van elke hoop een groot (20 liter) mengmonster genomen. Hiervan werd na goed mengen in het laboratorium een kleiner monster genomen voor de uiteindelijke bepalingen. De monsters werden in duplo gemeten. Er waren dus zes herhalingen van alle metingen. Alle monsters werden steeds bij 4°C bewaard. Alle bepalingen hierna genoemd werden uitgevoerd aan dezelfde submonsters.

Bepaald werden:

1. chemische analyses: organisch stofgehalte en nutriëntengehaltes (NPK)
2. stabiliteit van de compost m.b.v. een OxiTop OC 110 (WTW)

De totale koolstof- en stikstofgehalten werden bepaald met een standaard methode, de zogenaamde Dumas methode, gevolgd door detectie in een Fisons elementenanalyse apparaat. Ook werd het gehalte aan organische stof bepaald. Daartoe werd de grond gedurende 24 uur verhit bij 105°C om al het water te doen verdampen. Vervolgens werd de grond verast (3 uur bij 550°C) om al de organische stof te verbranden. Het organisch stofgehalte is het percentageverschil tussen het gewicht van de veraste grond en de luchtdroge grond. De totale P en K gehalten werden bepaald door een commercieel lab in Oosterbeek.

In het OxiTop systeem werd de zuurstofopname (Oxygen Uptake Rate, afgekort als OUR) van het compost monster gemeten gedurende 7 dagen. De OUR is een waarde waarmee de afbreekbaarheid van het materiaal wordt aangegeven. Deze neemt af naarmate de compost rijpt. Een lagere waarde betekent minder afbreekbaar materiaal, oftewel een grotere stabiliteit van de compost.

3.2.4 Statistische analyses

De temperatuurgegevens van de EM en controlebehandelingen werden voor alle tijdstippen vergeleken met de tweezijdig gepaarde T-test met een 95%-betrouwbaarheidsinterval in Excel. De temperaturen op de verschillende locaties in de hopen werden apart vergeleken voor de EM en controlebakken.

3.3 Resultaten

3.3.1 Temperatuur

In de eerste maand steeg de temperatuur op meerdere plaatsen in de composthopen boven de 60°C en verschillende keren zelfs 70°C of hoger. Dit gold zowel voor de EM bakken als voor de controle bakken. De temperatuur van de composthopen met EM behandeling was meestal hoger dan die van de controlehopen. Als voorbeeld is het temperatuurverloop over de totale composteerperiode weergegeven in Figuur 5, voor de plek waar de thermokoppel van bovenaf in het centrum gestoken was tot een diepte van 40 cm.

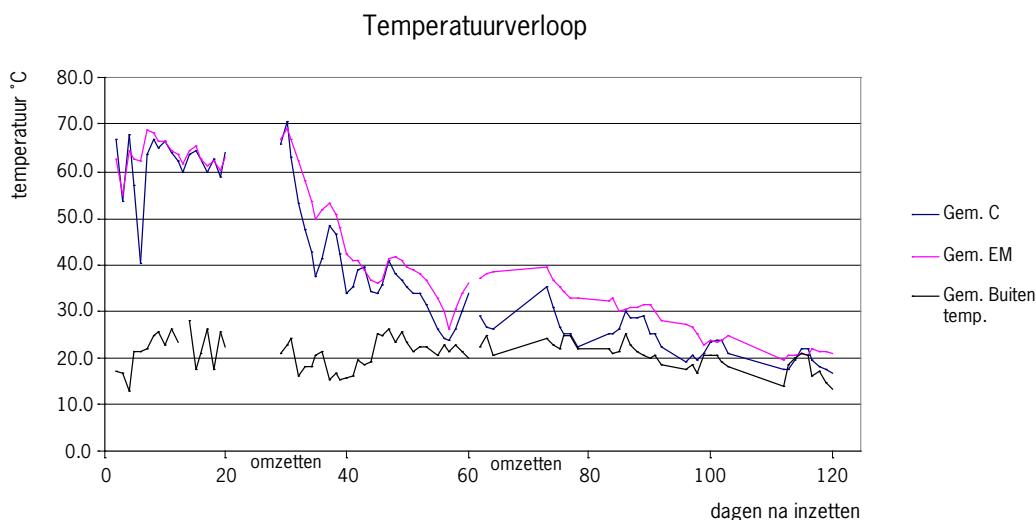


Fig. 5. Temperatuur in “centrum boven” gedurende de gehele onderzoeksperiode. De gemiddelden van de controle hopen en de composthopen waaraan EM is toegevoegd zijn weergegeven, alsmede die van de omgevingstemperatuur.

De resultaten waren vergelijkbaar voor alle andere meetpunten. Er waren ofwel geen statistisch significante verschillen tussen de EM en controle behandelingen, of wel de temperatuur van de EM behandeling was significant hoger dan die van de controlebehandeling (Tabel 1).

meetpunt	1e periode	2e periode	3e periode
Centrum boven	niet significant	EM hoger Dag: 52, 53, 55 t/m 59	EM hoger Dag: 61, 63, 64, 75
Zijkant Hoog	EM hoger Dag: 8, 9, 11, 12, 13	EM hoger Dag: 59, 60, 61	niet significant
Zijkant Midden	niet significant	EM hoger Dag: 44, 45, 48, 49, 52 t/m 57, 58	niet significant
Zijkant Laag	niet significant	EM hoger Dag: 49	EM hoger Dag: 72 t/m 78, 82 t/m 90, 92, 99, 100

Tabel 1: Perioden (voor en na de twee omzettingen van de composthopen) waarin al dan niet significant verschillen tussen de EM en controle behandelingen voorkwamen met een betrouwbaarheidsinterval van 95%, voor de verschillende meetpunten in de compostbakken. Alleen de dagen waarin minstens 5 aaneengesloten waarnemingen van de 24 waarnemingen per dag significant verschilden zijn weergegeven.

3.3.2 CO₂

De CO₂ productie in de composthopen met toevoeging van EM was in het algemeen hoger dan in die zonder toevoeging. De verschillen waren echter niet statistisch significant doordat er te grote verschillen waren tussen de herhalingen. Alleen de meting op dag 25 was statistisch aantoonbaar hoger in de composthopen met EM-toevoeging.

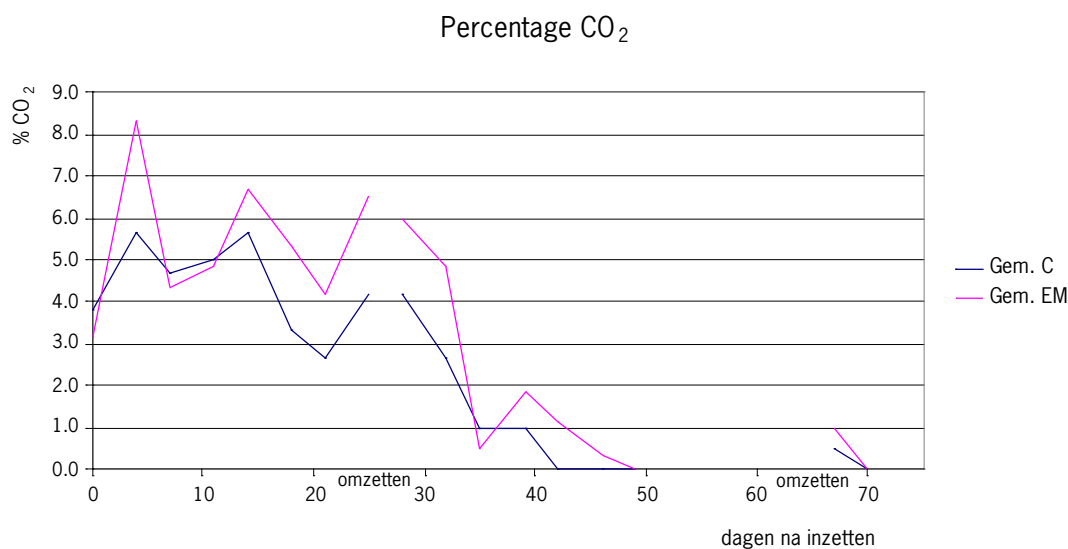


Fig. 6. De gemiddelde percentages gemeten CO₂ in de controle composthopen en de hopen met EM gedurende 3 opeenvolgende periodes.

3.3.3 Chemische analyses

Het gemiddelde organische stof gehalte was een klein beetje lager in de EM compost dan in de controle compost (Tabel 2), maar dit verschil was niet statistisch significant. Ook de waarden voor de gehalten aan N, P, en K waren niet significant verschillend.

	Organische stof (g/kg)	Ntot N (g/kg)	Ptot P (g/kg)	Ktot K (g/kg)
C	788,1	31,1	4,0	18,6
EM	752,7	30,5	3,7	18,1

Tabel 2: Uitkomsten van de chemische analyses.

3.3.4 Compost stabiliteit

Na vier maanden composteren zag het materiaal er goed uit, hoewel de stengels nog niet voldoende gecomposteerd leken (Fig. 7). Er waren geen duidelijke verschillen te zien tussen de behandelingen.



Fig. 7. Het materiaal in één van de bakken na 4 maanden composteren.

De zuurstofopname-snelheid (OUR) was vergelijkbaar voor de EM compost en de controle compost (Tabel 3). Ook hier werden na statistische analyse geen significante verschillen gevonden.

Controle	EM toegevoegd
2,76	2,86

Tabel 3. Gemeten OUR waarden in mmol O₂/kg materiaal/uur.

3.4 Conclusies

Uit de temperatuur en CO₂ metingen blijkt dat er in het algemeen geen verschillen waren in het temperatuur- en CO₂-verloop tussen de verschillende behandelingen. De temperatuur in de composthopen met EM-toevoeging was zeker zo hoog als in de composthopen zonder EM-toevoeging, soms zelfs significant hoger. In beide gevallen werden op meerdere plaatsen in de verschillende composthopen temperaturen boven de 60°C of zelfs 70°C gemeten. Volgens de producent van EM zou door toevoeging van EM voor het composteren de temperatuur minder hoog worden en zou daardoor minder materiaal “verbranden” wat de waarde ten goede zou komen. Hierbij moet echter wel gewezen worden op de verschillen tussen het composteren in bakken en commercieel composteren in uitgestrekte heuvels die regelmatig gekeerd worden. De compost in de gebruikte bakken werd slechts twee maal gekeerd.

Ook uit de bepalingen die werden gedaan om de stabiliteit en de nutriëntensamenstelling van de verschillende behandelingen weer te geven bleken geen aantoonbare verschillen te komen.

De door de producent geclaimde werking konden dus in dit experiment niet aangetoond worden.



4 Het effect van de toepassing van EM-bokashi op de ziekteverwerendheid van de bodem

4.1 Inleiding

4.1.1 Achtergrond

Voor een goede plantengroei is een gezonde bodem met een grote verscheidenheid aan bodemleven nodig. Als een bodem wordt verstoord, heeft dit effect op het bodemleven en dit kan leiden tot zwakkere en zieke planten. Dit scenario leidt tot grote schadeposten voor de boer. In de gangbare landbouw worden pesticiden gebruikt om bodem- en bladziekten te onderdrukken en dit leidt tot een verstoord bodemleven (Engelen et al., 1998). Het gebruik van pesticiden en de negatieve bijwerkingen van deze middelen leidt de laatste tientallen jaren tot steeds meer kritiek, want men is bezorgder geworden om het milieu (Lazarovitz, 2001).

In relatie tot het gebruik van pesticiden worden EU milieuwetten steeds meer aangescherpt. Het is dus voor boeren van belang om hun gewassen op een milieuvriendelijker wijze te telen.

In vergelijking met chemische toepassingen in de landbouw, is de hedendaagse toepassing van microbiële middelen relatief klein (Bashan, 1998). Echter, voor de ontwikkeling van betrouwbare microbiële middelen als aanvulling op chemische middelen is de interesse toegenomen. Onderzoek heeft uitgewezen dat microbiële middelen potentieel hebben (Tanii et al., 1990; Ryder & Rovira, 1993), maar er moet nog veel onderzoek worden gedaan naar veel aspecten van de effecten, productie en toepassing van deze middelen.

Een gezond bodemleven is vooral van belang in de biologische landbouw, waar behandeling met pesticiden niet is toegestaan. Het gebruik van microbiële middelen zoals EM zou een goed alternatief kunnen bieden voor het verminderen van effecten van plantenziekten en voor het verhogen van de gewasopbrengsten in de biologische landbouw (Higa, 1994).

4.1.2 Ziekteonderdrukkende gronden

De bodem is rijk aan micro-organismen (Tabel 4). Per gram grond kunnen wel 10^9 bodemorganismen aanwezig zijn (Gobat et al., 2004). De meeste micro-organismen in de grond zijn ongevaarlijk voor planten; slechts een klein deel is (potentieel) ziekteverwekkend (Higa, 1998). Bodemgebonden pathogenen kunnen problemen veroorzaken onder omstandigheden die gunstig zijn voor hun groei, activiteit en reproductie. Populaties van deze pathogenen kunnen dan snel toenemen, maar als deze gunstige condities weer veranderen, zal de pathogeenpopulatie weer afnemen tot de originele toestand (Bashan, 1998).

Tabel 4. Rijkdom van levende organismen in de grond. Deze schatting omvat alle continenten (n.t.b. = niet te bepalen) (Gobat et al., 2004)

Organismen	Aantal bij benadering		Gemiddelde biomassa	
	Per g droge grond	Per m ²	Kg ha ⁻¹ in de toplaag van 20 cm	% (zonder plantenwortels)
Bacteriën	10^6 – 10^9	10^{11} – 10^{14}	1500	25
Schimmels	n.t.b.	n.t.b.	3500	59
Algen	10^3 – 10^5	10^8 – 10^9	10–1000	kleiner dan 0.5
Ééncelligen	10^4 – 10^6	10^9 – 10^{11}	250	4
Bodemdiertjes (zonder ééncelligen)	10^2 – 10^3	10^5 – 10^6	1–5000	12
Plantenwortels	n.t.b.	n.t.b.	6000	-
Totaal	n.t.b.	n.t.b.	≈12000	100

De meeste gezonde gronden hebben de eigenschap om bepaalde ziekten te kunnen onderdrukken. Ziekteonderdrukkende gronden worden gekarakteriseerd door minimale aanwezigheid van

ziekten, ondanks de aanwezigheid van ziekteverwekkende organismen en van gevoelige gastheerplanten (Mazzola, 2002). Ziekteonderdrukkende gronden zijn vaak beschreven in relatie tot vele plagen en ziekten, waaronder *Pythium ultimum* en *Rhizoctonia solani* (Mathre et al., 1999; Weller et al., 2002).

Er zijn twee typen ziekteonderdrukking tegen bodemgebonden plantenpathogenen bekend (Weller et al., 2002; Garbeva et al., 2004):

1. Algemene ziekteonderdrukking is gerelateerd aan de totale microbiële biomassa in de grond, die met de pathoog om voedingsstoffen en water concurreert of die remming van de groei of activiteit van de pathoog veroorzaakt (antagonisme). Dit type ziekteonderdrukking is niet over te dragen van grond op grond. Algemene onderdrukking wordt versterkt door toevoeging van organische stof, goede bodembewerking en de opbouw van bodemvruchtbaarheid, die de microbiële activiteit van de bodem stimuleren (Weller et al., 2002).
2. Specifieke ziekteonderdrukking ontleent haar activiteit aan de effecten van individuele of bepaalde groepen micro-organismen op bepaalde pathogenen. Dit type ziekteonderdrukking is wél overdraagbaar van grond op grond.

Veel studies zijn verricht naar micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de ziekteonderdrukking van een grond (Bashan, 1998; Mazzola, 2002). Ook is geprobeerd om deze verantwoordelijke micro-organismen te identificeren. Immers, als deze specifieke organismen bekend zijn, kan men een microbiel mengsel (inoculum) maken en toedienen aan andere, minder ziekteonderdrukkende gronden.

4.1.3 Microbiële inocula; gebruik en beperkingen

4.1.3.1 Wisselwerkingen van microbiële inocula met het bodemleven en planten

Het introduceren van specifieke bacteriën en schimmels in landbouwgronden wordt reeds tientallen jaren toegepast. Microbiële inocula worden toegepast met als doel om (i) de grond voedingsstoffen te leveren; (ii) plantengroei te stimuleren; (iii) de activiteit van plantenpathogenen te controleren of te remmen; (iv) de bodemstructuur te verbeteren en (v) koolwaterstofverontreinigingen af te breken (Van Veen et al., 1997). De meeste hedendaagse inocula worden gebruikt voor akkerbouwgewassen zoals peulvruchten en in mindere mate voor granen. Maar er zijn ook vele hoogwaardige gewassen zoals bloemen, kasgewassen en biologisch geteeld fruit en groenten, waarbij voor de teelt het gebruik van chemische middelen niet wenselijk is of niet is toegestaan (Bashan, 1998). De meeste hedendaagse succesvolle inocula bevatten *Rhizobium* bacteriën (Van Elsas & Heijnen, 1990; Bashan, 1998). *Rhizobium* inocula worden gebruikt om de stikstofbindende capaciteit van vlinderbloemigen te vergroten. Het meeste onderzoek op het gebied van de biologische bestrijding van plantenpathogenen wordt verricht naar bacteriën of schimmels, die een pathogene schimmels kunnen controleren of remmen (Whipps, 2001). Pathogene schimmels zijn verantwoordelijk voor de meeste ziekteproblemen in de landbouw.

In de natuur wordt de activiteit van bacteriën en schimmels gereguleerd door ecologische factoren zoals een beperkte voorziening van voedingsstoffen of predatie door andere organismen. Dit houdt de microbiële populaties relatief constant (Gobat et al., 2004). De ecologie van schimmels en bacteriën wordt daarnaast ook gecontroleerd door de algemene eigenschappen van de bodem zoals het vochtgehalte.

4.1.3.2 Het gebruik van microbiële inocula voor de onderdrukking van plantenziekteverwekkers

Micro-organismen die in de rhizosfeer (de directe nabijheid van de plantenwortels) groeien zijn ideaal om pathogenen te onderdrukken, want de rhizosfeer is het eerste defensiemechanisme van de wortel tegen aanvallen van pathogenen (Weller, 1988). Pathogenen ondervinden antagonisme van micro-organismen in de rhizosfeer vóór en tijdens de primaire infectie en ook gedurende de eventuele daaropvolgende secundaire verspreiding over het worteloppervlak.

Microbiële inocula kunnen onderdrukking van pathogenen induceren door diverse mechanismen (Parr et al., 1994; Whipps, 2001). Het meest algemene mechanisme is (i) competitie voor voedingsstoffen, ruimte en groei. Parasitisme (ii) is een specifiek onderdrukkingsmechanisme. Antibiotica (iii) die biostase (inactiviteit) of biocide effecten (afdoening) van plantpathogenen bewerkstelligen, kunnen ook worden geproduceerd. Sommige micro-organismen produceren stoffen die specifieke delen van de stofwisseling in pathogenen remmen (iv) of die giftige stoffen geproduceerd door

de pathogeen onschadelijk kunnen maken (v). Andere micro-organismen kunnen resistentiemechanismen van de plant tegen pathogenen activeren (vi).

Enkelvoudige microbiële inocula bevatten één soort van een micro-organisme en zijn soms succesvol toegepast tegen bodemgebonden pathogenen, hoewel het moeilijk bleek om deze resultaten te reproduceren. In het onderzoek door Van den Boogert et al. (1990) werd een afname in het aantal ziektegevallen in aardappelen veroorzaakt door *Rhizoctonia solani* aangetoond, wanneer de schimmelparasiet *Verticillium biguttatum* werd toegepast. Wanneer *V. biguttatum* op de poot-aardappelen werd gebracht, resulteerde dit in een zichtbare vermindering van de productie van overlevingsstructuren door *V. biguttatum* op de nieuw gevormde knollen.

In de praktijk is het waarschijnlijk dat mengsels van micro-organismen voor geïntegreerde bestrijding nodig zullen zijn. Deze meervoudige microbiële inocula laten in het algemeen een betere ziektebestrijding zien, hoewel de samenstelling van het mengsel van de stammen het resultaat sterk beïnvloedt. Er zijn daarentegen ook resultaten van onderzoek beschikbaar die bij gebruik van meervoudige microbiële inocula in vergelijking met de enkelvoudige, een vergelijkbaar of zelfs een mindere biologische bestrijding lieten zien (Hervas et al., 1998; Larkin & Fravel, 1998).

Omdat de resultaten van microbiële toepassingsexperimenten niet algemeen reproduceerbaar zijn, wordt het gebruik van microbiële inocula vaak bekritiseerd. Vaak wordt gedacht dat nuttige micro-organismen op natuurlijke wijze zullen toenemen, indien grondverbeteraars van organische oorsprong aan de bodem worden toegevoegd. Toevoeging van een relatief kleine hoeveelheid nuttige micro-organismen daarentegen, zal door de reeds gevestigde en overweldigende microflora geen verandering in het microbiële evenwicht teweeg brengen. Het effect van de biologische bufferende capaciteit wordt gedemonstreerd in diverse onderzoeken (Mousseaux et al., 1998; Weller et al., 2002).

Wortelbacteriën die op zaden worden geïntroduceerd bereiken aanvankelijk hoge populatiedichtheden, maar deze houden meestal geen stand omdat ze alsnog door wortelbacteriën worden weggeconcurrereerd (Weller et al., 2002).

4.1.3.3 Beperkingen en uitdagingen voor microbiële inocula

De belangrijkste beperking voor de toepassing van microbiële inocula is het probleem van reproduceerbare en het gebrek aan constante resultaten (Bashan, 1998; Breeuwsma & De Boer, 2004). Bepaalde microbiële culturen worden gepromoot als effectieve bestrijder van een groot aantal bodemgebonden plantenziekten, terwijl ze in feite slechts effectief zijn tegen bepaalde pathogenen onder geconditioneerde omstandigheden. Onder veldcondities echter, houden veel beweringen over deze enkelvoudige microbiële inocula geen stand. Bij toepassing van enkelvoudige microbiële inocula in de bodem worden door veel onderzoekers geen effecten gevonden (Van Elsas & Heijnen, 1990; Mousseaux et al., 1998). Als een microbiële inoculum de bodemmicroflora effectief zal kunnen controleren, bestaat het waarschijnlijk uit een soortenmengsel van micro-organismen en niet uit slechts één soort micro-organisme (Higa & Parr, 1994).

Het gebruik van soortenmengsels wordt bekritiseerd, omdat het moeilijk is om duidelijk aan te tonen welke micro-organismen verantwoordelijk zijn voor de waargenomen effecten, hoe de geïntroduceerde en gevestigde micro-organismen op elkaar inwerken en wat het effect is van de introductie op de bodem en de plantomgeving (Whipps, 2001). Om een succesvol microbiële mengsel te maken, is het ten eerste van belang om een goede kennis te hebben van de groei- en overlevingskarakteristieken én de nutriënten- en omstandighedenbehoeften van elk van de samenstellende micro-organismen (Mathre et al., 1999). Ten tweede, is het van belang om van elk van de samenstellende micro-organismen de ecologische relaties en wisselwerkingen met andere organismen te begrijpen; hieronder valt hun vermogen om voort te bestaan in een mengsel van micro-organismen en in de grond na toepassing van dit mengsel.

Microbiële inocula kunnen op diverse wijzen worden toegediend; een juiste keuze is van cruciaal belang voor de mate van overleving van de micro-organismen. Voor EM-toediening kunnen verschillende producten worden verkregen (Higa, 1998). Het vloeibare EM1 dient als uitgangsmateriaal. Hiervan wordt via fermentatie EM-Actief (EM-A) gemaakt, dat direct op grond en planten kan worden gesproeid. Het kan ook worden toegevoegd aan organisch materiaal, dat een voedselbron en micro-leefruimte vormt voor de effectieve micro-organismen. Indien EM-A aan organisch materiaal wordt toegevoegd en vervolgens wordt vergist, ontstaat een product dat EM-Bokashi wordt genoemd. Dit vergiste organisch materiaal kan door de grond worden gemengd. Indien na toediening hiervan de EM microflora zich zou vestigen en stabiliseren, zouden de effecten blijvend zijn en zouden er geen verdere toedieningen meer nodig zijn (Higa, 1998). Nieuwe EM-toedieningen zijn

nodig als (1) organische verbeteraars die als voedingsbronnen kunnen dienen, niet meer worden toegediend of (2) de grond wordt blootgesteld aan flinke droogte of (3) aan overstroming.

Het veronderstelde werkingsspectrum van EM in de landbouw is zeer breed. Higa beweert dat door toevoeging van EM aan het grond/plant ecosysteem de bodemkwaliteit, bodemgezondheid, gewasopbrengst en -kwaliteit en zelfs dier- en mensgezondheid verbetert. Echter, voor een succesvolle toepassing is het van essentieel belang dat de veldomstandigheden en -bewerkingen optimaal zijn. Micro-organismen kunnen alleen effectief zijn, als de omstandigheden voor overleving en vermenigvuldiging geschikt zijn, zoals bijvoorbeeld de beschikbaarheid van voedingsstoffen, water en zuurstof en een juiste zuurgraad en temperatuur. Volgens de producenten kan EM een extra hulpmiddel zijn om bodem- en gewasmanagement te optimaliseren, maar het is geen vervanging voor andere managementtechnieken (Higa & Parr, 1994).

4.1.4 Bestanddelen EM

EM bevat 80 verschillende soorten effectieve micro-organismen, die ingedeeld kunnen worden in 5 groepen en die naast elkaar kunnen bestaan in een vloeibaar mengsel (Higa, 1988). De 5 groepen zijn fotosynthetische bacteriën, melkzuurbacteriën, gisten, actinomyceten (draadvormige bacteriën) en vergistende schimmels.

Fotosynthetische bacteriën maken met behulp van zonlicht bestanddelen, die door planten of andere bacteriën kunnen worden gebruikt. Sommige fotosynthetische bacteriën binden stikstof uit de lucht. Volgens Higa (1998) zijn de fotosynthetische bacteriën de belangrijkste bevorderaar voor de werking van de andere micro-organismen in EM. Melkzuurbacteriën onderdrukken schadelijke micro-organismen door de productie van melkzuur (Tortora et al., 1997). Gisten kunnen anti-microbiële bestanddelen produceren. Sommige actinomyceten kunnen schadelijke schimmels en bacteriën onderdrukken (Kulik, 1996). Vergistende schimmels kunnen organisch materiaal onder zuurstofloze omstandigheden afbreken, waardoor stank wordt onderdrukt en aantastingen door schadelijke insecten wordt voorkomen (Higa, 1998).

Van Egeraat (1998) heeft de organismen in een vloeibaar EM1 mengsel onderzocht in het laboratorium. EM1 bevat ongeveer 10^7 micro-organismen per ml. Het overgrote deel van de micro-organismen ($5-10 \times 10^6$ per ml) bestaat uit melkzuurbacteriën. Op de tweede plaats komen de gisten (10^5 per ml). Andere micro-organismen zijn in zeer lage concentraties aanwezig of zijn afwezig. Speciale testen om fotosynthetische bacteriën aan te tonen gaven geen resultaat. De aanwezigheid van schimmels en actinomyceten werd niet aangetoond; deze micro-organismen groeien niet in afwezigheid van zuurstof, dus het is niet waarschijnlijk dat ze in een anaeroob gefermenteerd product zullen voorkomen. Onverdunde EM1 remde de groei van bacteriële ziekteverwekkers, waarschijnlijk door de lage zuurgraad veroorzaakt door het melkzuur in het product. Schimmels en gisten kunnen een lage zuurgraad verdragen. Als EM1 100 maal wordt verdund is de remmende werking afwezig (concentratie melkzuur is dan te laag). Het is dus onwaarschijnlijk dat EM-A in de geadviseerde, verdunde dosering enig effect zal hebben (Van Egeraat, 1998).

4.1.5 EM producten

Er zijn diverse EM-producten verkrijgbaar (Higa, 1996; Agriton, 2006). EM1, EM5, EM-Bokashi and EM-gefermenteerd plantenextract worden gebruikt in de plantenweek. In dit onderzoek werden EM1 en EM-Bokashi gebruikt, die in meer detail zullen worden behandeld.

EM1 is het uitgangsmateriaal met effectieve micro-organismen. De micro-organismen in EM1 bevinden zich in rustfase en dienen te worden geactiveerd door toevoeging van water en melasse. Voor activering wordt een suspensie gemaakt van water, melasse en EM1 in de verhouding van 90: 5: 5 (volumeprocenten) (Agriton, 2006). Deze suspensie dient gedurende 7 dagen te worden gefermenteerd; het uiteindelijke product wordt EM-A (EM-Actief) genoemd.

EM-Bokashi is een vast substraat met toegevoegde effectieve micro-organismen. Bokashi is Japans voor gefermenteerd organisch materiaal. Bokashi is het groeimedium voor de effectieve micro-organismen en verschaft deze een geschikte micro-omgeving bij toediening aan grond. In grond geïntroduceerde micro-organismen hebben de grootste overlevingskans als ze in staat zijn om toe te treden tot beschermende micro-omgevingen (Van Elsas, 1990). Om EM-Bokashi te maken wordt EM-A toegevoegd aan organisch materiaal (bijvoorbeeld zaagsel, mest of bladma-

teriaal) waarin de micro-organismen zich kunnen vermenigvuldigen. De afbraaksnelheid van het gekozen organisch materiaal bepaalt in hoge mate de overleving van de geïntroduceerde micro-organismen. Bokashi kan worden gemaakt via aerobe of anaerobe fermentatie.

Agriton adviseert anaerobe fermentatie dat, in tegenstelling tot aerobe fermentatie, het voordeel heeft dat een lagere temperatuur tijdens het proces behouden blijft. Het nadeel van anaerobe fermentatie is dat hiervoor een luchtdicht vat nodig is, waardoor het duurder wordt en productie van EM-Bokashi slechts op kleine schaal kan plaatsvinden. Geadviseerd wordt om 4 tot 10 ton EM-Bokashi per hectare toe te passen. EM-Bokashi kan 12 maanden lang worden opgeslagen met behoud van EM activiteit (Agriton, 2006).

EM-Bokashi bevat gewoonlijk meer schimmels en gisten dan EM-A. Higa (1998) beveelt aan om minimaal drie verschillende soorten organisch materiaal te gebruiken voor het bereiden van EM-Bokashi. De kwaliteit van EM-Bokashi kan worden verbeterd door zeeschelpenkalk en kleimineralen toe te voegen. Zeeschelpenkalk brengt een langzame toename in zuurgraad teweeg. De meeste gronden zijn licht zuur; toevoeging van zeeschelpenkalk zorgt dus voor een meer neutrale zuurgraad van de grond. De micro-organismen in EM groeien optimaal bij een neutrale zuurgraad. Kleimineralen worden gebruikt om hun eigenschap geladen deeltjes benodigd voor de plantengroei (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+) te kunnen binden. Deze gebonden elementen worden weer vrijgegeven indien de hoeveelheid vrije geladen deeltjes in het grondwater afneemt.

In brede kringen wordt erkend dat toevoeging van organisch materiaal zoals mest en compost aan de grond de activiteit van micro-organismen verhoogt en onderdrukking van grondgebonden ziekten kan induceren (Hoitink & Fahy, 1986; Craft & Nelson, 1996). Één van de doelen van dit onderzoek is om de invloed van toevoeging van organisch materiaal (Bokashi) zonder eventuele effecten van EM op ziekteonderdrukking te bestuderen door gesteriliseerde EM-Bokashi toe te voegen naast de normale EM-Bokashi. In veel onderzoeken wordt deze invloed niet onderzocht (Lee & Cho, 1993; Xu et al., 1999).

4.1.6 Eerder EM onderzoek

Beperkt onderzoek heeft plaatsgevonden naar de effecten van effectieve micro-organismen op bodemgezondheid en plantengroei. De meeste van deze studies echter zijn niet betrouwbaar en missen een wetenschappelijke aanpak. De resultaten van enkele betrouwbare studies worden opgesomd:

- EM-onderzoek met een ziekteverwekkende bodemschimmel op lupine en een Australische inheemse groenblijvende heester liet een significant grotere overleving van zaailingen op EM-behandelde grond zien. Diverse EM-producten onderdrukten significant de groei van de schimmel in de eerste weken na de toevoeging van de producten. Enkele EM-behandelingen verdrongen in 3 maanden tijd de ziekteverwekker volledig. De overleving van de planten was niet toe te schrijven aan de microbiële activiteit van de met EM-producten behandelde gronden, want deze was niet zichtbaar anders dan de microbiële activiteit in de controlegrond (Aryantha & Guest, 2000).
- EM-onderzoek met een ziekteverwekker die wortelrot bij erwt veroorzaakt liet geen ziekteonderdrukking door EM-A zien in vergelijking met de controle (Merfield et al., 1998). Een alternatieve EM-bereiding zoals toevoeging van EM aan organische stof werd aangedragen als mogelijke verbetering.
- Gebruik van EM-Bokashi tegen *Pythium* in hyacint en tulp resulteerde in ziekteonderdrukking door EM. Er vond uitstel van besmetting van wortels plaats bij met EM-Bokashi behandelde gronden. Uiteindelijk werden alle wortels besmet. Toevoeging van EM-Bokashi in afwezigheid van de ziekteverwekker resulteerde niet in een hoger bolgewicht (Breeuwsma & De Boer, 2004).
- Behandeling van tarwezaad met EM had een significant effect op de veroorzaker van steenbrand. Het ziekteniveau nam af met 87% bij gebruik van hoge EM-doseringen. De kiemkracht en opkomst in het veld werden daarentegen ook negatief beïnvloed. Vergelijkbare resultaten met gesteriliseerde EM demonstreerden dat stofwisselingsproducten van de micro-organismen en niet de EM zélf verantwoordelijk waren voor de waargenomen effecten (Borgen, 1997).

4.1.7 Doelstellingen

De onderzoeksvraag “welk effect heeft de toepassing van EM-bokashi op de ziekteverendigheid van de bodem?” (2.2.2) leidt tot de volgende onderzoeksdoelstellingen:

- Bewijzen of EM-Bokashi effect heeft op de ziekteonderdrukking van biologische gronden
- Bepalen of een toegenomen ziekteonderdrukking wordt veroorzaakt door de toevoeging van EM of van organisch materiaal
- Bepalen of EM-Bokashi een verschil oplevert in de ziekteonderdrukking van verschillende bodemgebonden schimmels
- Bepalen of toepassing van EM-Bokashi een verandering in de microbiële diversiteit van de bodem veroorzaakt

4.2 Materiaal & methoden

4.2.1 Algemene methodologie

Grondmonsters werden verzameld bij Velt-leden met een moestuin op een perceel waar minstens 3 jaar biologisch geteeld was. Uitsluitend zandgronden werden verzameld, omdat deze het meest gevoelig zijn voor bodemgebonden ziekten. Ieder grondmonster bestond uit een mengsel van submonsters, die tot een diepte van 20 cm uit de moestuinen waren genomen. Bijlage 1 geeft een overzicht van specificaties van deze gronden, analyseresultaten en welke gronden in de diverse bio-toetsen (zie 4.2.2) werden gebruikt.

Er werden twee soorten Bokashi bereid: Bokashi met en zonder EM. De instructies van Agriton werden nauwkeurig gevolgd. Bladafval van prei, kool en tarwestro werden in gelijke hoeveelheden bijeengevoegd, in kleine stukken gesneden en vervolgens goed gemengd. Dit substraat werd over twee vaten van 34 liter verdeeld. In één vat werd EM-A (Agriton) toegevoegd in een concentratie van 1.23 l per 100 kg vers substraat. Aan beide vaten werden Edasil-kleimineralen en zeeschelpenkalk toegevoegd, beide in een concentratie van 2.50 kg per 100 kg vers substraat. De inhoud van beide vaten werd goed gemengd, waarna de vaten luchtdicht werden afgesloten om anaerobe fermentatie op gang te brengen. Door de aanwezigheid van een drukventiel in het dekselvat werd drukopbouw binnenin het vat voorkomen. Het substraat werd gedurende 6 weken bij 25°C gefermenteerd. Het substraat in beide vaten was na deze periode nog niet gefermenteerd en leek nog steeds op het uitgangsmateriaal. De inhoud van beide vaten stonk, terwijl EM-Bokashi een zoetige gefermenteerde geur, zoals de geur van bier, zou moeten hebben. Bokashi moest dus op een andere wijze worden verkregen.



EM-Bokashi werd beschikbaar gesteld door Agriton, de Nederlandse leverancier van EM (Fig. 8). Een deel van de EM-Bokashi werd in een zak gesteriliseerd (121°C) om de effectieve micro-organismen te doden en het effect van de toevoeging van organisch materiaal te testen. Na de sterilisatieprocedure werd de zak gedurende twee dagen open aan de lucht blootgesteld zodat micro-organismen uit de lucht op de gesteriliseerde Bokashi konden neerdalen. De standaard en gesteriliseerde Bokashi werden tot gebruik luchtdicht opgeslagen bij 20°C en volgens de aanbevelingen van Agriton in een concentratie van 5% op volumebasis aan de gronden toegevoegd.

Fig. 8. EM-Bokashi van Agriton.

De zaden werden vóór gebruik in de experimenten gedurende 1 minuut ontsmet met bleekmiddel (1% op volumebasis), waarna de zaden grondig werden gespoeld met kraanwater om restanten bleekmiddel te verwijderen.

Met uitzondering van de *Pythium* bio-toets, werden in alle bio-toetsen meststoffen aan de potten toegevoegd. Hiertoe werden biologische mestkorrels (Culterra, Workum, Nederland; N-P-K: 10-4-6) tot poeder vermalen en toegevoegd volgens de aanbevelingen van de leverancier in een hoeveelheid van 12 g per liter verse grond.

4.2.2 Besmettingsniveaus van natuurlijk voorkomende pathogenen

De eerste bio-toets werd uitgevoerd om het besmettingsniveau van natuurlijk voorkomende pathogenen in de 15 verzamelde gronden te testen. De reden hiervoor was om onderscheid te kunnen maken tussen eventueel natuurlijk aanwezige ziektekiemen en toegevoegde ziektekiemen van een bepaalde schimmelsoort.

In een geconditioneerde kweekcel (20°C, RLV 60%, 16 uur licht per dag) werd een kiemingsproef uitgevoerd, waarbij 5 testplanten werden gebruikt, die gevoelig zijn voor verschillende grondgebonden ziekten: Wortel (cv. Nantes) en komkommer (cv. Hoffmans Giganta) om te testen op omvalziekten, vlas (cv Regina) om te testen op verwelkingsziekten, tomaat (cv Moneymaker) om te testen op wortelrot en Chinese kool (cv. Granaat) om te testen op knolvoet.

Per grondmonster werden per plantensoort elk 3 potten ingezet. Een pot werd ingezaaid met tomaat (10 zaden), komkommer (10 zaden), peen (15 zaden), vlas (15 zaden) of Chinese kool (7 zaden). Gedurende een periode van 6 weken, werd tweemaal per week de opkomst en gezondheid van de zaailingen bepaald.

Met behulp van deze observaties werden drie gronden geselecteerd, die de minste symptomen van zaailingziekten op de gastheerplanten vertoonden; in dit rapport worden dit de “gezonde gronden” genoemd. Ook werden drie gronden geselecteerd, die de meeste ziektesymptomen lieten zien (“zieke gronden”). Een grond die besmet wordt ten behoeve van een experiment wordt besmette grond genoemd.

4.2.3 Effecten van EM op de gezonde gronden

Om het effect van EM op algemene grondgebonden ziekten te testen, werden de drie gezonde gronden gebruikt voor bio-toetsen in de kas. Van elk van de gronden werden drie EM-grondbehandelingen ingezet:

1. grond verrijkt met EM-Bokashi (5% op volumebasis)
2. grond verrijkt met gesteriliseerde EM-Bokashi (5% op volumebasis)
3. grond zonder toevoegingen (de controle)

Twee verschillende bio-toetsen werden uitgevoerd voor elke grondbehandeling:

1. *Pythium* bio-toets met de ziekteverwekker *Pythium ultimum* en komkommer als gastheer plant (komkommer cv. Hoffmans Giganta)
2. *Rhizoctonia* bio-toets met de ziekteverwekker *Rhizoctonia solani* en peen (cv. Nantes) als gastheer

4.2.3.1 *Pythium* bio-toets

Er werden voor deze bio-toets drie grondbesmettings-behandelingen toegepast:

1. Besmette grond met een hoge inoculumdosering (0.5 % op volumebasis)
2. Besmette grond met een lage inoculumdosering (0.05 % op volumebasis)
3. Onbesmette grond (de controle)

De grondbesmettingen werden gerealiseerd met behulp van een inoculum van *Pythium ultimum*, die onder geconditioneerde omstandigheden in het laboratorium was opgekweekt.

Voor deze bio-toets werden de 3 gezonde gronden gebruikt. Het aantal ingezette objecten in deze bio-toets was:

3 (gronden) x 3 (EM-behandelingen) x 3 (grondbesmettingen) = 27 objecten

Een object werd gecreëerd door één van de EM-behandelingen en één van de pathogeen besmettingen in één van gronden te realiseren, waarna de grond goed werd gemengd. Potten werden met het grondmengsel gevuld en vervolgens werden per pot 9 komkommerzaden ingezaaid.

Per object werden 5 potten (herhalingen) ingezet; het aantal ingezette potten was dus:

27 (objecten) x 5 (herhalingen) = 135 potten

De potten werden in de kas (20°C, 16 uur licht per dag) geplaatst en de opkomst van de zaailingen en de ontwikkeling van de ziekte (Fig. 9) werd tweemaal per week gedurende drie weken bekeken.



Fig. 9. Matige opkomst en reeds één zieke komkommerplant in een experimentele pot

4.2.3.2 *Rhizoctonia* biotoets

Ook voor deze biotoets werden de 3 gezonde gronden gebruikt. Per grond werden de drie EM-behandelingen gerealiseerd, waarna de grond goed werd gemengd. In de lengte gehalveerde PVC-pijpen (lengte 40 cm, diameter 6 cm) dienden als biotoets -pot, waarin 500 ml van een EM-behandelde grond werd gebracht. In elke pijp werd een rij wortelzaadgroepen gezaaid, waarbij elke groep uit 10 zaadjes was opgebouwd. Voor deze groepsvorming werd gekozen om ervoor te zorgen dat de ziekteverwekker niet bovengronds van plant tot plant kon worden overgedragen, maar in of op de grond moest groeien, waarbij een wisselwerking met de bodemmicroflora moest worden aangegaan. Per pijp werden 17 groepen gezaaid met een onderlinge afstand van 2.5 cm. De pathogeen *Rhizoctonia solani*, die onder geconditioneerde omstandigheden in het laboratorium was opgekweekt, werd aan het begin van elke rij tegen de eerste plant in de grond gebracht. Het aantal ingezette objecten in deze biotoets was:

$3 \text{ (gronden)} \times 3 \text{ (EM-behandelingen)} = 9 \text{ objecten.}$

Per object werden 7 pijpen (herhalingen) ingezet; het aantal ingezette pijpen is dus:

$9 \text{ (objecten)} \times 7 \text{ (herhalingen)} = 63 \text{ pijpen.}$

De pijpen werden in de kas (20°C, 16 uur licht per dag) geplaatst, waarover een transparante PVC tent werd geplaatst om een relatieve luchtvochtigheid van 100% te realiseren. Dit is van belang voor een goede ontwikkeling van deze pathogeen. De opkomst van zaailingen en de ontwikkeling van de ziekte (Fig. 10) werd tweemaal per week gedurende vier weken bekeken. De afstand tussen het inoculatiepunt en de eerste gezonde planten werd als maat gebruikt voor ziekteonderdrukking.



Fig. 10. Ontwikkeling van *Rhizoctonia solani* in de biotoets

4.2.4 Effecten van EM op de zieke gronden

Het effect van EM op natuurlijk voorkomende ziekten in drie zieke gronden werd bestudeerd. Van elk van de gronden werden drie EM-behandelingen ingezet (zie 4.2.3) en goed gemengd. De behandelde gronden werden in potten gedaan, waarna in twee van de drie behandelde zieke gronden drie gastheerplanten (peen, komkommer of vlas) werden gezaaid.

Van de laatste grond was bekend dat er besmetting van knolvoet aanwezig was, dus werd er Chinese kool gebruikt als toetsplant. De Chinese kool werd daartoe in potgrond gezaaid en na drie weken werden in elke pot met behandelde zieke grond 3 plantjes overgebracht. Per behandeling werden 5 potten (herhalingen) ingezet. De potten werden in de kas (20°C, 16 uur licht per dag) geplaatst en de opkomst en ziekteontwikkeling werd geobserveerd gedurende 6 weken.

4.2.5 Karakterisering van de grond

Grondmonsters werden gedurende 24 uur bij 40°C gedroogd, waarna de zuurgraad en N-P-K van deze luchtdroge monsters werd bepaald. Ook werd het gehalte aan organische stof bepaald. Daartoe werd de grond gedurende 24 uur verhit bij 105°C om al het water te doen verdampen. Vervolgens werd de grond verast (3 uur bij 550°C) om al de organische stof te verbranden. Het organisch stofgehalte is het percentageverschil tussen het gewicht van de veraste grond en de luchtdroge grond.

4.2.6 Myceliumgroeitest

De myceliumgroeitest is een test waarin de groei van een schimmelmycelium van een testpathogeen kan worden bekeken. Een dun doorlaatbaar vlies (membraan) wordt over een grond gespannen, waarna de schimmel op het membraan wordt gebracht. In een ziekteonderdrukkende grond wordt de myceliumgroei geremd.

In dit onderzoek werd de methode van Blok and Bollen (1996) gebruikt om te bepalen wat het effect is van de EM-behandelingen op de pathogeenonderdrukking van de drie gezonde gronden. Uit ervaring (W. Blok, 2006) was gebleken dat *Fusarium oxysporum* het meest bruikbare pathogeen is voor deze methode.

Van elk van de gezonde gronden werden vier EM-behandelingen ingezet:

1. grond normaal verrijkt met EM-Bokashi (5% op volumebasis)
2. grond sterk verrijkt met EM-Bokashi (25% op volumebasis)
3. grond normaal verrijkt met gesteriliseerde EM-Bokashi (5% op volumebasis)
4. grond zonder toevoegingen (de controle)

Een extra groeitest werd ingezet met dezelfde vier behandelingen, die vervolgens werden gesteriliseerd. Dit werd gedaan om te bepalen of de gevonden effecten in de test het gevolg zijn van de aanwezigheid van de EM (biologisch effect) of zijn toe te schrijven aan de aanwezige stoffen

in de Bokashi en/of de stofwisselingsproducten geproduceerd door de EM (chemisch effect). Behandelde grond werd in 2.5 l zakken gedaan en gedurende drie weken in een klimaatcel (20°C) geplaatst, waarna de grond werd geanalyseerd (zie 4.2.5). Cellofaan membraan met een dikte van 17.5/1000 mm werd over aluminium ringen (diameter 75 mm, hoogte 8 mm) gespannen en met een rubber band vastgezet. Deze ringen werden in glazen afgesloten schaaltes geplaatst, gevuld met een laagje water en gesteriliseerd (15 min bij 121 °C). Vervolgens werd het water uit de schaaltes verwijderd en werden de ringen gevuld met 25 ml grond, waaraan 20 ml handwarme wateragar (agar concentratie 1.5%) werd toegevoegd. Bij het afkoelen van de agar stolt deze en wordt een vaste laag verkregen die vastkleeft aan het membraan. Van elk van de behandelingen worden 5 ringen (herhalingen) ingezet. De ringen werden in een incubator (25°C) geplaatst met het membraan aan de onderkant, zodat stoffen afkomstig van de behandelde grond als gevolg van de zwaartekracht langzaam naar beneden richting het membraan zouden gaan. Na een dag werden de ringen omgedraaid en werd *Fusarium oxysporum* in het midden van de ringen op het membraan geënt. Na 7 dagen werd de diameter van het mycelium bepaald (Fig. 11).

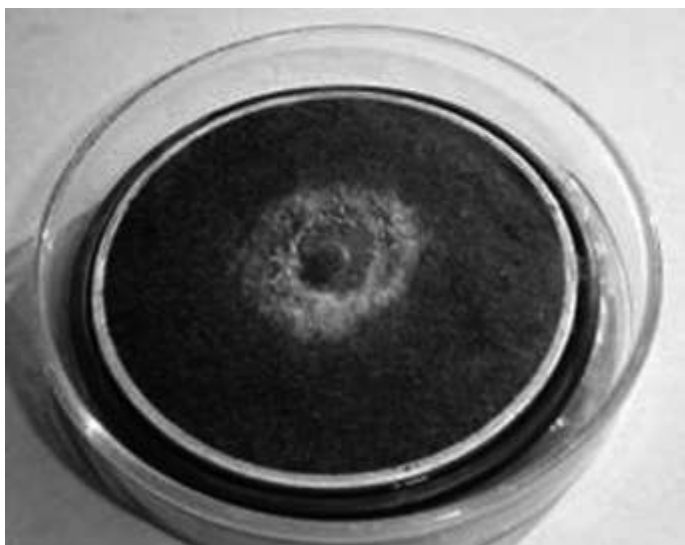


Fig. 11. Opzet *Fusarium oxysporum* myceliumgroei test

4.2.7 Ademhalingstest

Om de microbiële activiteit van de gronden te bepalen, werd de ademhaling ofwel productie van kooldioxide (CO₂) gemeten. Met behulp van deze test werd bepaald wat het effect is van toevoeging van EM-Bokashi op de ademhaling. Als toevoeging van EM-Bokashi resulteert in een grotere microbiële activiteit, wordt de productie van CO₂ groter. Door lucht met een bekende snelheid over een bekende hoeveelheid grond in een liggende buis te leiden, zal door de ademhaling de CO₂ concentratie verhogen. Door het verschil te meten in CO₂ concentratie tussen de ingaande en uitgaande lucht van de buis, kan de ademhaling worden bepaald en worden uitgedrukt in µg CO₂ per g droge grond per uur. Voor deze meting is het van belang dat de buizen met grond in een constante omgevingstemperatuur van 20°C liggen en dat de doorgaande lucht bevochtigd is, zodat de grond niet uitdroogt.

Er werden vier gronden met drie EM-behandelingen per grond (zie 4.2.3) getest. De gronden werden in plastic zakken goed gemengd met de EM-Bokashi en vervolgens opgeslagen bij 20°C, waarbij de zakken tweemaal per week werden gemengd. De ademhaling van twee van de behandelde gronden werd gemeten één week na het mengen van de gronden; de andere twee gronden werden gemeten acht weken na het mengen. Door deze tijdsverschillen in voorbehandeling en ademhalingsmeting werden deze grondparen als onafhankelijke experimenten beschouwd. Glazen buizen werden elk gevuld met 100 g behandelde grond en in een incubator (20°C) geplaatst (Fig. 12). Over de grond in de buizen werd bevochtigde lucht met een snelheid van 54.8 liter per minuut geleid. De ademhaling werd gedurende 24 uur gemeten met een CO₂ analyseapparaat (Analytical Development Co., Hoddesdon, England). Het vochtgehalte van de grond werd bepaald om de CO₂-productie uit te kunnen drukken op basis van drooggewicht.

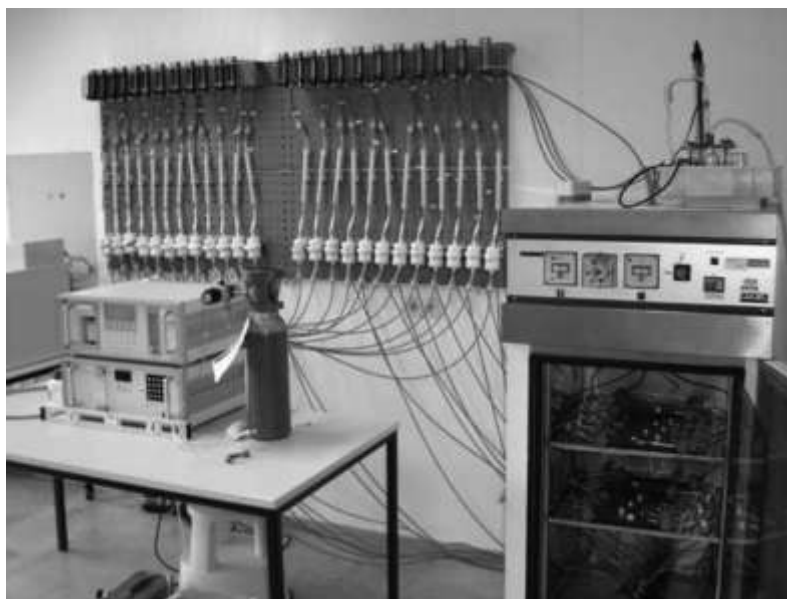


Fig. 12. Opzet ademhalingstest. Lucht wordt door de liggende buizen in de incubator geleid en wordt na droging via het systeem aan de muur het CO₂ analyseapparaat in geleid. Door een schakel-systeem wordt het meten van de CO₂ tussen buizen afgewisseld.

4.2.8 Bacteriële soortensamenstellingstest

Met de bacteriële soortensamenstellingstest wordt onderzocht of de diversiteit van bodembacterieleven verandert door de toediening van EM. Hierbij wordt het DNA van planten, dieren en/of micro-organismen in de grond of organisch materiaal (Bokashi) geïsoleerd en wordt een soortenmengsel van DNA verkregen. In dit onderzoek werd de bacteriële soortensamenstelling bepaald. In het verkregen mengsel van DNA bevinden zich vele stukken verschillend DNA, die o.a. afkomstig zijn van verschillende soorten bacteriën. De volgorde van bouwstenen in het DNA van elke bacteriesoort verschilt namelijk. De bacteriële soortensamenstelling van het DNA-mengsel is representatief voor de bacteriële soortensamenstelling in het oorspronkelijke monster. De hoeveelheid DNA in dit mengsel is echter te klein om te bepalen hoeveel soorten DNA en in welke verhouding het mengsel bevat. Daartoe wordt met de PCR-techniek heel specifiek het DNA van alleen bacteriën vermenigvuldigd. Hierbij verandert de verhouding van de verschillende soorten niet. Een stuk DNA uit een bacterie kan bij een succesvolle PCR wel 1 miljard kopieën opleveren. Met behulp van de DGGE-techniek kunnen de verschillende bacterie DNA-soorten in een verticale gel door middel van het aanbrengen van een spanningsverschil over de gel worden gescheiden (Fig. 13) en na kleuring zichtbaar worden gemaakt voor het menselijk oog. Hierdoor ontstaat een bandenpatroon. Elk bandje in dit patroon staat in het algemeen voor één bacteriesoort. De dikte of intensiteit van dit bandje is een maat voor de hoeveelheid bacteriën in het oorspronkelijke monster. Omdat DNA van een bepaalde bacteriesoort na vergelijkbare stroombehandelingen steeds op dezelfde hoogte in de verticale gel verschijnt, kan de verandering van de bacteriële soortensamenstelling of diversiteit van een monster in de tijd worden gevolgd. In dit onderzoek bijvoorbeeld, kan worden onderzocht of toevoeging van EM-Bokashi invloed heeft op de oorspronkelijke bacteriële samenstelling van een grondmonster en of de EM in de Bokashi na toevoeging aan de grond zich kunnen handhaven of uitbreiden.

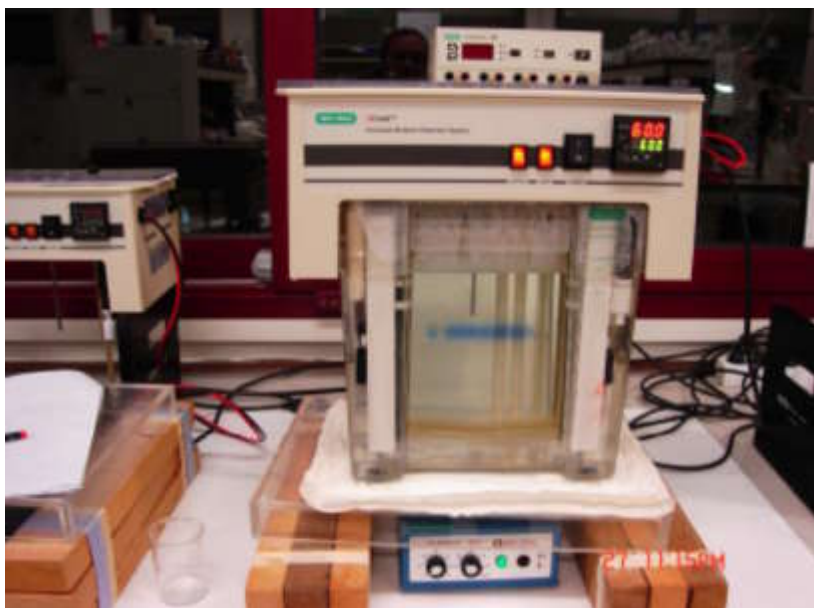


Fig. 13. Scheiding van bacterieel DNA in een verticale gel bij 100 V gedurende 16 uur. De DNA-monsters worden in uitsparingen boven in de gel opgebracht. Het DNA migreert o.i.v. een spanningsverschil naar beneden. De blauwe lijn geeft de voortgang van het proces aan.

In dit onderzoek is de keuze gemaakt om de pijlen te richten op het bacteriële leven in de grond. Tijdens de PCR-techniek wordt heel specifiek het bacterieel DNA vermenigvuldigd. DNA afkomstig van andere micro-organismen in EM-A suspensie, EM-Bokashi of grond, zoals schimmels en gisten, worden tijdens de PCR niet vermenigvuldigd, zodat de verandering van deze groepen micro-organismen na bijvoorbeeld toevoeging van Bokashi aan grond niet in de tijd kan worden gevolgd.

Er werden twee gezonde gronden met drie EM-behandelingen per grond (zie 4.2.3) getest. Potten van 500 ml werden gevuld met de behandelde gronden, waarin tomatenzaailingen (cv Moneymaker) van 14 dagen oud werden geplant. Deze tomatenzaailingen werden in potgrond opgekweekt. Uit de literatuur (Van Rijn et al., 2007) is bekend dat tomatenplanten gevoelig zijn voor veranderingen in de bodemmicroflora, wat tot uitdrukking komt in de microbiële samenstelling rond de wortels (rhizosfeer). De potten werden in de kas bij een temperatuur van 20°C en een lichtperiode van 16 uur per dag geplaatst. Na 2 en 3 weken werd aan elke pot 150 ml opgeloste kunstmest (N-P-K-MgO= 19-6-20-3) toegevoegd.

Na 6 weken werden monsters genomen van de rhizosfeer en bulkgrond (onbewortelde grond). In een eerder stadium werden bulkgrondmonsters genomen direct na het behandelen van de gezonde gronden met EM-Bokashi en werden monsters genomen van de EM-Bokashi, de gesteriliseerde EM-Bokashi en EM-A suspensie (zie 4.2.1). Variatie tussen twee aangeleverde en gebruikte EM-Bokashi-partijen en twee EM-A suspensies gedurende het onderzoek werd ook bepaald door hiervan monsters te nemen. Tevens werden monsters genomen van het resultaat van de poging om Bokashi zélf te maken (zie 4.2.1), met en zonder EM, met als doel om te bepalen of de EM micro-organismen het slecht gefermenteerde substraat hadden gekoloniseerd.

Van de monsters werd DNA geïsoleerd, waarna met behulp van de PCR-techniek de hoeveelheid bacterieel DNA in de monsters specifiek werd vermenigvuldigd. Vervolgens werd DGGE uitgevoerd, waarbij de bacterie-DNA-mengsels op een verticale gel werden gebracht. Na het aanbrengen van een spanningsverschil over de gel (100 V gedurende 16 uur) werden na kleuring van de gel de bandenpatronen zichtbaar gemaakt (Fig. 14). Het bandenpatroon van alle objecten werd met de specifieke software (Phoretix 1D, Nonlinear Dynamics Ltd, UK) geanalyseerd. Van elk monster werd van het bandenpatroon het aantal bandjes geteld en werd de diversiteitsindex berekend. Deze diversiteitsindex is een waarde die groter wordt bij een toenemend aantal bandjes én bij een evenredige verdeling van de intensiteit van de bandjes in het bandenpatroon (Van Vliet et al., 2006). Vervolgens werd met de software bekeken in hoeverre toevoeging van gesteriliseerde of niet-gesteriliseerde Bokashi de soortensamenstelling van de grond beïnvloedde.

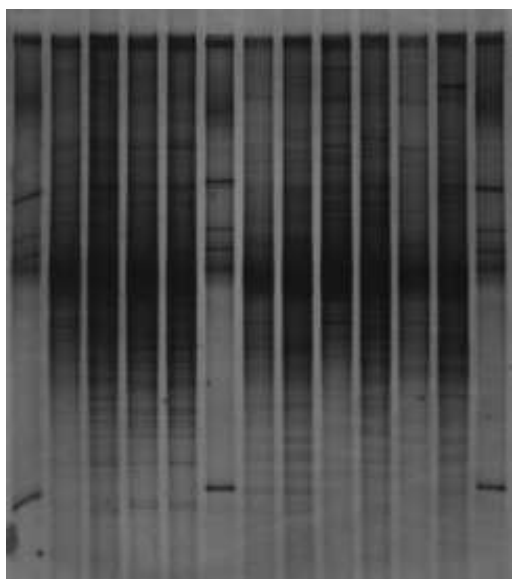


Fig. 14. Voorbeeld van een gekleurde gel met bacterieel DNA-bandenpatronen van 10 grond- en 3 referentiemonsters.

4.3 Resultaten

4.3.1 Besmettingsniveaus van natuurlijk voorkomende pathogenen

In de eerste biotoets, waarin het besmettingsniveau van natuurlijk voorkomende pathogenen van 15 gronden werd gescreend, werden diverse verschillen waargenomen. Uit de resultaten van deze toets werden drie gronden geselecteerd, die de beste kieming van testplantzaden en de minst geïnfecteerde kiemplanten te zien gaven. Tevens werden drie gronden geselecteerd die de meeste ziektesymptomen lieten zien. In deze toets, maar ook in volgende experimenten, bleek het moeilijk om het vochtgehalte van de zandgronden op een juist niveau te houden. Het probleem met zandgronden is namelijk dat ze snel uitdrogen door een kleine waterhoudende capaciteit. Bij gebruik van natuurlijke gronden is het altijd moeilijk om constante resultaten te verkrijgen; bodemeigenschappen zoals de aanwezigheid van voedselbronnen en de waterhoudende capaciteit variëren en storende factoren zoals van nature voorkomende pathogenen kunnen de experimentele resultaten beïnvloeden. Voor praktische toepassing echter, is het relevant om natuurlijke gronden voor de experimenten te gebruiken. Om het effect van onbekende factoren te verminderen, zijn alle experimenten met ten minste twee verschillende gronden per experiment uitgevoerd.

4.3.2 Gezonde gronden met EM

4.3.2.1 *Pythium* biotoets

Het *Pythium ultimum* inoculum was zeer effectief; de hoge inoculumdosering (0.5% op volumebasis) gaf een klein opkomstpercentage van de planten en bijna alle opgekomen planten waren ziek. Een vernietigend effect van het *Pythium* inoculum werd verkregen in grond 3. In de controlegrond waren slechts enkele zaailingen gezond en in de behandelingen met EM-Bokashi overleefde geen enkele plant. De lage inoculumdosering (0.05% op volumebasis) vertoonde een hoge ziektegraad, dus in het vervolg werden voor analyse alleen de resultaten van lage inoculumdosering- en controlebehandelingen gebruikt.

Er werden grote verschillen in het aantal gezonde planten tussen de gronden en tussen de grondbehandelingen waargenomen (Fig. 15). De met *Pythium* geïnoculeerde gronden vertoonden een kleinere plantenopkomst, maar ook in de niet-geïnoculeerde gronden werden verschillen in opkomst waargenomen (vergelijk grond 1 met 2 en 3).

Met behulp van statistische analyses werden de resultaten getoetst om gefundeerd uitspraken te kunnen doen over het effect van de gronden en EM-behandelingen op de opkomst en ziekteontwikkeling van de testplanten. Zo werd via statistische toetsen een significant verschil gevonden tussen de effecten van gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi, maar deze verschillen

waren tussen de besmette en onbesmette gronden niet eenduidig. Voor de onbesmette grond 1 bijvoorbeeld, werd een kleiner percentage gezonde planten gevonden bij de behandeling met niet-gesteriliseerde EM-Bokashi in vergelijking met de gesteriliseerde behandeling; dit duidt op een negatief effect van EM op de plantengroei. Maar voor de besmette grond 1 was het percentage gezonde planten juist groter in de niet-gesteriliseerde EM-Bokashibehandeling; dit duidt op mogelijke onderdrukking van de toegediende pathogeen door EM. Grond 2 vertoonde echter tegenovergestelde resultaten.

Statistische toetsing van de besmette gronden met de onbesmette gronden per behandeling, leverde een significant groter percentage gezonde planten bij alle behandelingen in de onbesmette gronden in vergelijking met de besmette gronden.

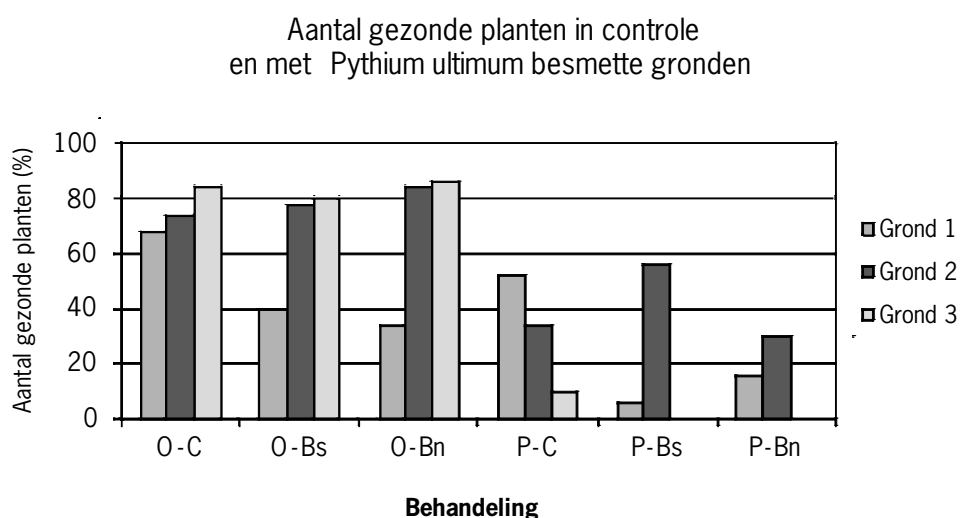


Fig. 15. Aantal gezonde planten in onbesmette (O) en *P. ultimum*-besmette (P) gronden met drie EM-grondbehandelingen: controle (C), gesteriliseerde Bokashi (Bs) en niet-gesteriliseerde Bokashi (Bn). De percentages zijn gemiddelden van resultaten van 5 herhalingen per object.

4.3.2.2 *Rhizoctonia* biotoets

De *Rhizoctonia solani* biotoets gaf betrouwbare resultaten bij één van de drie gronden. In de andere twee gronden was de opkomst van de zaailingen te onregelmatig, zodat de ontwikkeling van de schimmel door de gronden in de pijpen niet goed gemeten kon worden. De schimmel was in 4 weken tijd door de grond in de gehele pijp gegroeid, zowel in de controlegrond als in de met gesteriliseerde EM-Bokashi behandelde grond (Fig. 16).

Statistische analyse vertoonde een significant verschil tussen de gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi grondbehandeling. Er werd een mindere ontwikkeling van *Rhizoctonia* gevonden in de niet-gesteriliseerde Bokashi t.o.v. de gesteriliseerde Bokashibehandeling gevonden. Er was geen verschil tussen de controle en gesteriliseerde Bokashi grondbehandeling. Dit duidt op een onderdrukkend effect van EM, en niet van het toegevoegde substraat.

De pijpen met de verschillende Bokashibehandelingen werden drie weken na het experiment nogmaals geobserveerd. De ontwikkeling van *Rhizoctonia* door de grond in de pijpen was niet verder gegaan. Op dat moment waren de peenplanten dermate groot en stonden dermate dicht open dat ze elkaar in de groei belemmerden.

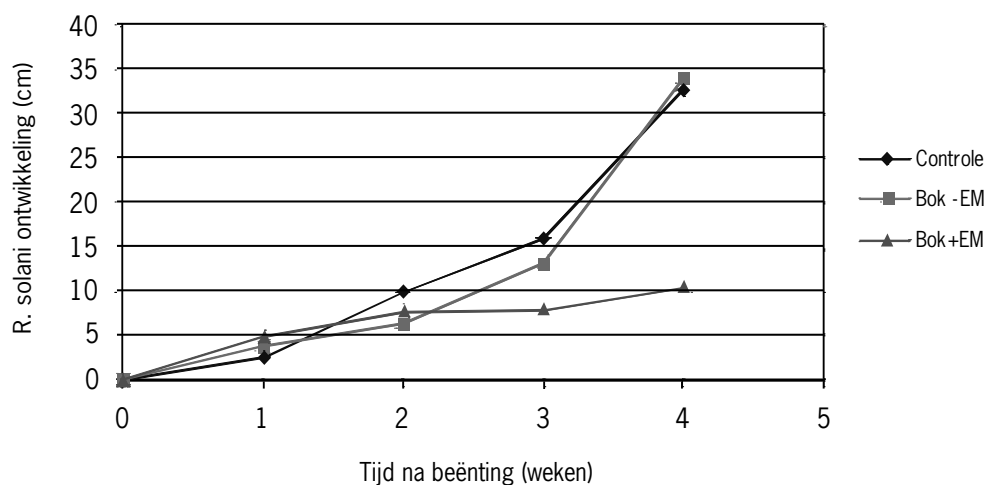
Ontwikkeling van *R. solani* door de grond

Fig. 16. Ontwikkeling van *R. solani* door de grond gedurende 4 weken. Drie EM-behandelingen werden gebruikt: een controle, gesteriliseerde EM-Bokashi (Bok-EM) en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi (Bok+EM). De waarden zijn gemiddelden van resultaten van 7 herhalingen per object.

4.3.3 Zieke gronden met EM

De biotoets met komkommer op de zieke gronden gaf bruikbare resultaten. Één zieke grond vertoonde geen omvalziekte, dus waarschijnlijk was deze grond van nature niet zwaar besmet met grondgebonden ziekten. De andere grond vertoonde een groot aantal besmette planten bij alle behandelingen (Fig. 17). Voor de statistische analyse werd het percentage gezonde planten na drie weken gebruikt. Statistische analyse liet geen significante verschillen zien tussen de controle en de behandelingen met de gesteriliseerde of niet-gesteriliseerde EM-Bokashi. Ook werden geen significante verschillen zichtbaar tussen een combinatie van beide Bokashi-behandelingen en de controle of tussen de gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi.

Het experiment met Chinese kool op de met knolvoet besmette grond gaf geen bruikbare resultaten. De planten groeiden goed, maar er werd na 7 weken geen knolvoet waargenomen bij de knolvoetgevoelige Chinese kool. Van deze grond was bekend dat er natuurlijke besmetting van knolvoet aanwezig was, maar waarschijnlijk was de besmettingsgraad niet hoog genoeg.

Het experiment met peen en vlas gaf geen betrouwbare resultaten. De variatie in opkomst van peenzaailingen tussen de potten was te groot om betrouwbare conclusies te trekken. De potten met vlas vertoonden dezelfde problemen als in het gezonde grondexperiment: slechte opkomst en ook fysiologische verwelking.

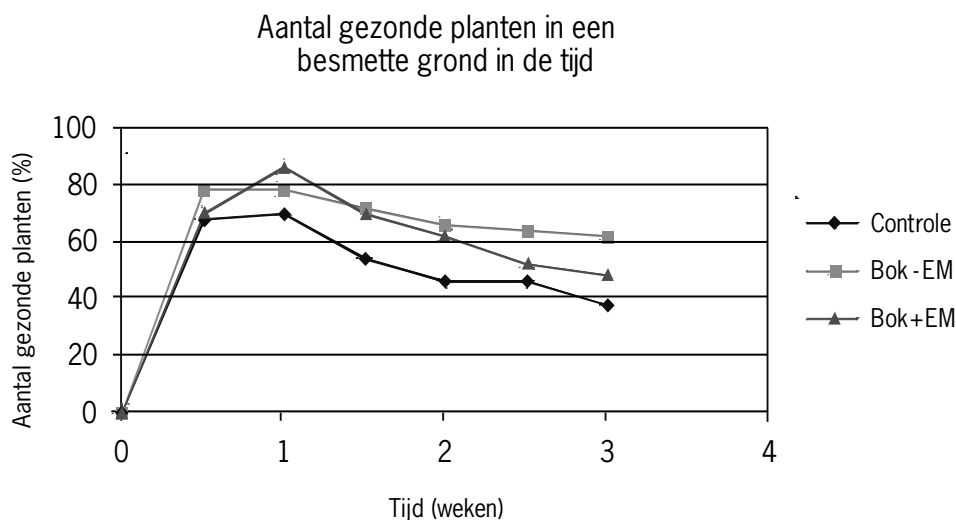


Fig. 17. Aantal gezonde zaailingen in een natuurlijk besmette grond gedurende drie weken. Drie EM-grondbehandelingen werden gebruikt: een controle, gesteriliseerde Bokashi (Bok-EM) en niet-gesteriliseerde Bokashi (Bok+EM). De getallen zijn gemiddelde percentages van 5 herhalingen.

4.3.4 Myceliumgroeitest

De resultaten van de myceliumgroeitest lieten geen grote verschillen tussen de EM-grondbehandelingen zien (Fig. 18). De behandeling met de hoge EM-Bokashi dosering (25% op volumebasis) gaf geen bruikbare resultaten. In de meeste gevallen was de myceliumdiameter na 5 dagen groter in vergelijking met de andere behandelingen, maar in sommige gevallen was het membraan waarop de schimmel groeide volledig vergaan. Bij deze ringen kon de myceliumgroei na vijf dagen niet worden gemeten. De behandeling met de hoge EM-Bokashi dosering werd in het experiment opgenomen, om te onderzoeken of een hogere EM-concentratie een grotere ziekteonderdrukking zou opleveren, resulterend in een kleinere myceliumdiameter. Dit was blijkbaar niet het geval, dus de resultaten van deze behandeling werden voor statistische analyse buiten beschouwing gelaten. Een bodemverrijking met organisch materiaal van 25% op volumebasis wordt evengoed in de praktijk niet gebruikt.

Statistische analyse gaf een significant grotere myceliumgroeisnelheid aan voor alle EM-behandelingen op de gesteriliseerde gronden in vergelijking met de verse gronden. Voor de verse gronden had de gecombineerde Bokashi behandeling een significant grotere myceliumdiameter tot gevolg in vergelijking met de controle. Dus deze EM en Bokashi behandelingen stimuleerden de groei van de pathogeen. Voor de steriele gronden had de gecombineerde Bokashi behandeling een significant kleinere myceliumdiameter tot gevolg in vergelijking met de controle. Er werden m.b.v. statistiek geen significante verschillen gevonden tussen de gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi behandelingen.

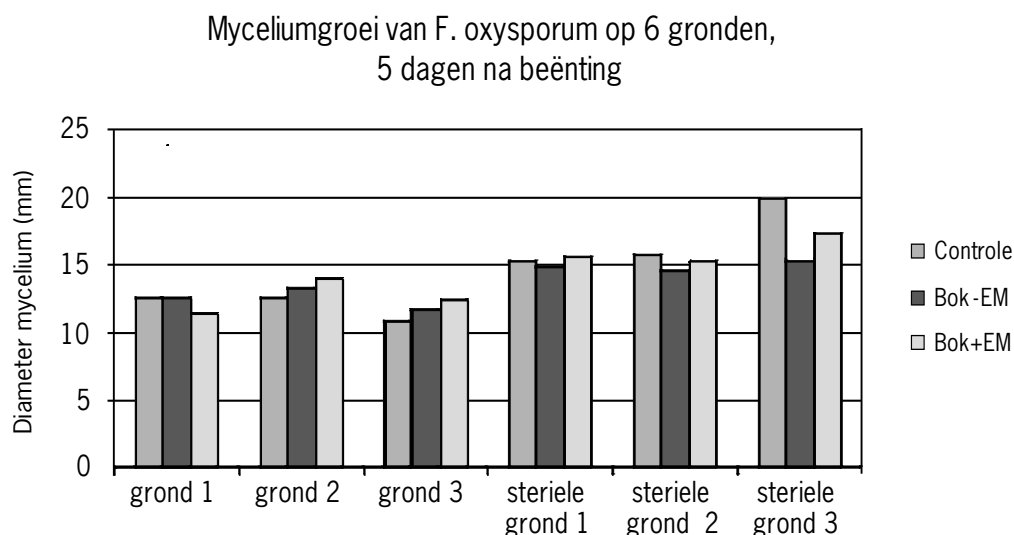


Fig. 18. Myceliumgroei van *Fusarium oxysporum*, vijf dagen na beënting. Drie verse gronden en drie gesteriliseerde gronden (steriele grond) werden gebruikt. Toegepaste EM-behandelingen zijn: controle, gesteriliseerde Bokashi (Bok-EM) en niet-gesteriliseerde Bokashi (Bok+EM). De getallen zijn gemiddelde diameters van het mycelium van 5 herhalingen.

4.3.5 Ademhalingstest

Tussen de behandelingen in de verse gronden (Fig. 19) werden grote verschillen in ademhaling gevonden. Statistische analyse gaf significante verschillen tussen de behandelingen aan. Contrastanalyse tussen beide Bokashibehandelingen en de controle gaf een significant verschil weer; de verrijking van de grond met zowel de gesteriliseerde als niet-gesteriliseerde variant van EM-Bokashi resulteerde in een veel grotere CO₂-productie. Er werden geen verschillen gevonden tussen de gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi.

Bij de rijpere grondmengsels werden enkele verschillen zichtbaar (Fig. 20), maar deze verschillen waren niet zo significant als bij de verse grondmengsels. Statistische analyse liet significante verschillen tussen de behandelingen en tussen de gronden zien. Contrastanalyse gaf ook bij de rijpe gronden een significant verschil tussen beide Bokashibehandelingen en de controle weer; beide Bokashibehandelingen gaven in vergelijking met de controle een grotere CO₂-productie. Er werden geen verschillen gevonden tussen de gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde EM-Bokashi. Het rijpe grondmengsel 2 gaf een significant grotere CO₂-productie dan het rijpe grondmengsel 1. Dus: toediening van Bokashi leidde tot een verhoogde ademhaling door de grotere beschikbaarheid van voedingsstoffen, onafhankelijk van de aanwezigheid van EM micro-organismen.

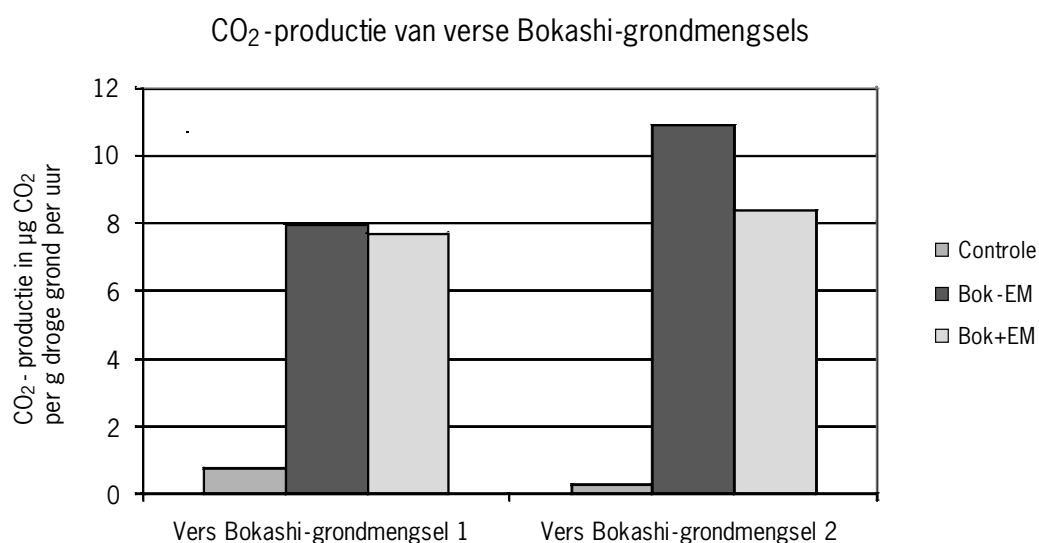


Fig. 19. CO₂-productie (ademhaling) van twee verse EM-Bokashigrondmengsels gemeten één week na het toepassen van de EM-Bokashibehandelingen. Toegepaste behandelingen zijn: controle, gesteriliseerde Bokashi (Bok-EM) en niet-gesteriliseerde Bokashi (Bok+EM). De weergegeven CO₂-productiewaarden zijn gemiddelden van 3 herhalingen.

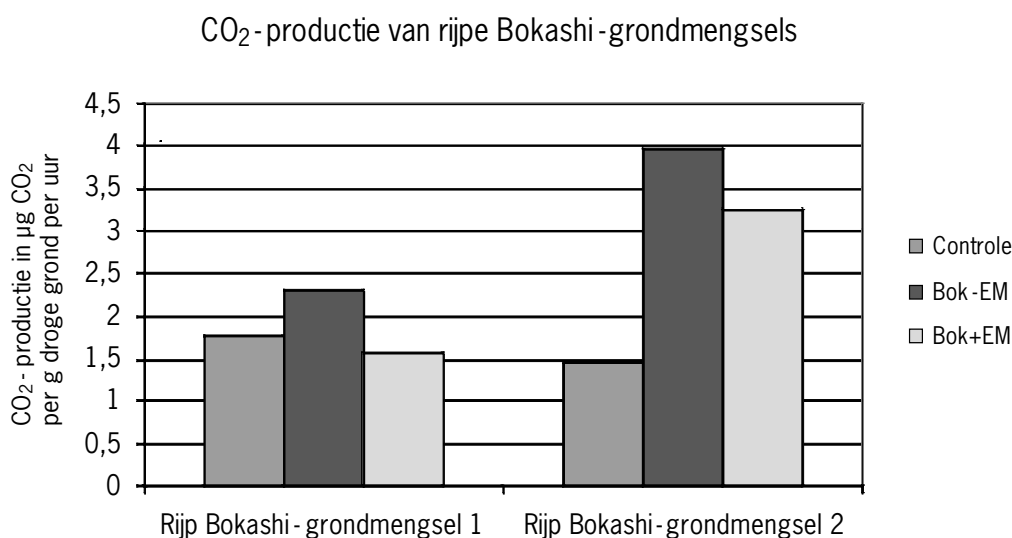


Fig. 20. CO₂-productie (ademhaling) van twee rijpe EM-Bokashigrondmengsels gemeten acht weken na het toepassen van de EM-Bokashibehandelingen. Toegepaste behandelingen zijn: controle, gesteriliseerde Bokashi (Bok-EM) en niet-gesteriliseerde Bokashi (Bok+EM). De weergegeven CO₂-productiewaarden zijn gemiddelden van 3 herhalingen.

4.3.6 Bacteriële soortensamenstellingstest

Analyse van de bandenpatronen leverde op, dat er zich verschillende aantallen en soorten micro-organismen in de twee aangeleverde EM-A suspensies bevonden. Uit het aantal bandjes en de intensiteit of dikte van deze bandjes werd de diversiteitsindex berekend (Tabel 5). EM-A suspensie 1 leverde meer bandjes en een hogere diversiteitsindex op dan EM-A suspensie 2. Het betekent dat er meer bacteriën in een meer evenredige verdeelde toestand in EM-A suspensie 1 voorkwa-

men in vergelijking tot suspensie 2. Tussen de twee aangeleverde EM-Bokashipartijen was er een klein verschil; er was een grote overeenkomst in de aanwezige bacteriesoorten tussen beide partijen; het aantal bacteriesoorten en diversiteitsindex verschilden iets. Onderlinge vergelijking van de zelfgemaakte "Bokashi" met en zonder de EM leverde enige variatie in bacteriesoorten op; deze variatie was niet terug te voeren op de toevoeging van de EM, want deze soorten werden niet teruggevonden in de EM-A suspensies of Bokashipartijen. De zelfgemaakte "Bokashi" had zeer weinig overeenkomsten in bacteriesoortensamenstelling met zowel de aangeleverde EM-A suspensies als met de aangeleverde Bokashipartijen. Bij het vergelijken van de aangeleverde EM-A suspensies met de Bokashipartijen viel op dat de Bokashi een groter aantal bacteriën in een meer evenredig verdeelde toestand herbergde, maar dat er zeer weinig soortensamenstellingensovereenkomsten waren.

Er werden verschillen gevonden tussen de twee gronden door verschillen in de natuurlijk voorkomende grondbacteriën. Grond 2 bevatte voor zowel de bulkgrondmonsters (t=0 en t=6) als voor de rhizosfeermonsters (t=6) een groter aantal bandjes en grotere diversiteitsindex dan grond 1 (Tabel 5). Er werden per grond echter geen significante verschillen gevonden tussen de verschillende behandelingen (controle, gesteriliseerde EM-Bokashi of niet-gesteriliseerde EM-Bokashi), zowel in de bulkgrondmonsters direct na het mengen (t=0), als in de bulkgrond- en rhizosfeermonsters op tijdstip t=6 weken.

Tabel 5. Bacteriële diversiteit uitgedrukt in aantallen banden en de diversiteitsindex in EM producten en grondmonsters. Bulkgrond- en rhizosfeermonsters werden verzameld op verschillende tijdstippen (0 en 6 weken) na het behandelen van de gezonde gronden met EM-Bokashi. Op tijdstip 0 weken is er nog geen rhizosfeergrond.

Monster	Type grondmonster	Aantal banden	Diversiteitsindex
EM-A suspensie 1		13	1.01
EM-A suspensie 2		10	0.95
Bokashi partij 1		22	1.20
Bokashi partij 2		20	1.24
Zelfgemaakte Bok-EM		29	1.23
Zelfgemaakte Bok+EM		29	1.2
Gronden t=0			
Grond 1 Controle	Bulkgrond t= 0	33	1.45
Grond 1 Bok-EM	Bulkgrond t= 0	32	1.41
Grond 1 Bok+EM	Bulkgrond t= 0	32	1.44
Grond 2 Controle	Bulkgrond t= 0	42	1.55
Grond 2 Bok-EM	Bulkgrond t= 0	43	1.58
Grond 2 Bok+EM	Bulkgrond t= 0	42	1.58
Gronden t=6			
Grond 1 Controle	Bulkgrond t= 6	29	1.38
Grond 1 Bok-EM	Bulkgrond t= 6	30	1.41
Grond 1 Bok+EM	Bulkgrond t= 6	32	1.40
Grond 2 Controle	Bulkgrond t= 6	44	1.55
Grond 2 Bok-EM	Bulkgrond t= 6	44	1.55
Grond 2 Bok+EM	Bulkgrond t= 6	41	1.54
Rhizosfeer t=6			
Grond 1 Controle	Rhizosfeer, t= 6	38	1.48
Grond 1 Bok-EM	Rhizosfeer, t= 6	39	1.48
Grond 1 Bok+EM	Rhizosfeer, t= 6	39	1.47
Grond 2 Controle	Rhizosfeer, t= 6	40	1.54
Grond 2 Bok-EM	Rhizosfeer, t= 6	40	1.55
Grond 2 Bok+EM	Rhizosfeer, t= 6	38	1.51

4.4 Conclusies

EM vertoonde geen algemeen ziekteonderdrukkend effect, behalve voor *Rhizoctonia solani* in één van de gronden. In het *Pythium*-omvalziekte experiment werd de ziekte soms zelfs gestimuleerd door EM-Bokashi. Toevoeging van EM had ook geen effect op de ziekteontwikkeling op van nature besmette gronden. De myceliumgroeitest toonde aan dat er ook geen schimmelremmend effect van EM op *Fusarium oxysporum* was.

EM werd toegepast door gronden te verrijken met Bokashi, waardoor niet alleen EM maar ook organisch materiaal werd toegevoegd. Dit organisch materiaal (met of zonder levende EM) verhoogde de bodemademhaling. Uit de resultaten van de ademhalingstest en het *P. ultimum* – komkommerexperiment bleek, dat toevoeging van Bokashi niet alleen het bodemleven in het algemeen stimuleert, maar mogelijk ook de ontwikkeling van plantenpathogenen zoals *P. ultimum*.

In de gronden met levende EM werd geen hogere microbiële activiteit gevonden dan in de controle gronden met gedode EM. Dit hoeft niet te betekenen dat de bodemmicroflora niet veranderd was door toevoeging van EM. Analyse van de bacteriesoortensamenstelling toonde echter aan dat toevoeging van EM aan de gronden geen significante verandering van de bacteriële populaties teweeg bracht. De schimmelsamenstelling zou echter wel veranderd kunnen zijn (Formowitz et al., 2007), maar dit is niet getest.

5. Algemene discussie

5.1. Compostering in het veld

Hoewel EM-A toegevoegd aan het te composteren materiaal soms leidde tot een verhoging van de temperatuur, had EM geen duidelijk effect op het verloop van het composteerproces, noch op het organisch stof gehalte en de nutriëntengehaltes van de geproduceerde compost. EM had zeker geen temperatuur-verlagend effect zoals geclaimd door de producent. Als er al een effect was, was het eerder een versnellend effect resulterend in een lager organisch stofgehalte en stikstofgehalte in het uiteindelijke product (hoewel niet significant). EM zou een ander effect kunnen hebben op de compostering en het uiteindelijke product in grotere composthoppen die regelmatig gekeerd worden (bijvoorbeeld eens per week). Het is echter waarschijnlijk dat de organismen in EM zich niet zouden kunnen vestigen in materiaal dat van zichzelf al rijk is aan micro-organismen, zoals biologisch geproduceerd plantenmateriaal. Als EM-organismen zich al zouden kunnen vestigen zou het merendeel van de toegevoegde organismen dood gaan tijdens de verhittingsperiode, zeker als temperaturen boven de 60°C worden bereikt.

5.2. Bokashi productie in het lab

De Bokashi werd gemaakt volgens de richtlijnen van Agriton. De richtlijnen zijn niet erg nauwkeurig opgesteld; het is een algemene beschrijving op welke manier de verschillende typen organisch materiaal dienen te worden gemengd om gefermenteerde Bokashi te verkrijgen. Ondanks een nauwgezette voorbereiding van het substraat en goede omstandigheden voor anaerobe fermentatie, was het substraat na 6 weken nog niet gefermenteerd. Mogelijke verklaringen kunnen zijn dat de fermentatieperiode voor de gebruikte substraten (bladafval van prei, kool en tarwestro) te kort was of dat het vochtgehalte van 59% te hoog was. Het is aannemelijk dat moestuinhouders bij het maken van Bokashi van tuinafval soortgelijke problemen zullen ondervinden. Het is van belang dat Agriton nauwkeuriger richtlijnen opstelt voor het zelf bereiden van Bokashi óf adviseert om zelf geen Bokashi te maken en het gefermenteerde product te kopen.

5.3. Ziekten- en pathogenenonderdrukking

***Pythium ultimum* - komkommer.** De beide Bokashi behandelingen vertoonden een kleiner aantal gezonde planten in vergelijking met de controle. Dit geeft aan dat Bokashi *P. ultimum* niet onderdrukt maar stimuleert. De toegevoegde Bokashi had zich waarschijnlijk niet voldoende gestabiliseerd. Ongerijpt en instabiel organisch materiaal zoals Bokashi dient niet alleen als voedselbron voor de effectieve micro-organismen, maar ondersteunt ook de ontwikkeling van ziekteverwekkers (Hoitink & Boehm, 1999). Tussen de behandelingen met gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde Bokashi werden verschillen waargenomen, maar deze verschillen waren niet eenduidig voor alle gronden en lieten geen algeheel ziekteonderdrukkend effect door EM zien. Uit dit onderzoek blijkt dat EM geen effect heeft en *P. ultimum* niet wordt onderdrukt zoals dat wel het geval was in een ander onderzoek (Breeuwsma & De Boer, 2005).

Zoals verwacht werd een groter aantal gezonde planten gevonden bij de onbesmette gronden in vergelijking met de *P. ultimum* besmette gronden. Bij de onbesmette gronden bleek met name grond 1 gevoelig voor een laag opkomstpercentage van de planten in vergelijking met de andere gronden. Dit is mogelijk te wijten aan natuurlijk voorkomende en dominante pathogenen in de grond. Een kleine opkomst en een klein aantal gezonde planten in de *P. ultimum* besmette gronden bewees dat het inoculum zeer effectief was.

***Rhizoctonia solani* - peen.** Bij deze biotoets werd een duidelijke ziekteonderdrukking door EM waargenomen. Hoewel deze resultaten werden verkregen uit slechts één experiment met één grond, werd in alle zeven herhalingen met niet-gesteriliseerde Bokashi een verminderde ziekteontwikkeling door *R. solani* in vergelijking met de andere behandelingen waargenomen. Er werd een significant verschil tussen de gesteriliseerde en niet-gesteriliseerde Bokashi aangetoond. Het ziekteonderdrukkend effect moest dus het resultaat zijn van de toegevoegde EM en niet het resultaat van de toevoeging van organisch materiaal alléén.

Zelfs na zeven weken had *R. solani* zich niet verder door de grond ontwikkeld. Dit geeft aan dat de groei van de pathogeen daadwerkelijk was gestopt door EM en niet slechts was vertraagd zoals

dat wel het geval was in een ander onderzoek (Breeuwsma & De Boer, 2004). Deze waarnemingen zijn een aanwijzing voor veelbelovende toepassingen van EM voor het terugdringen van problemen veroorzaakt door *Rhizoctonia solani* in sommige gronden, maar niet in andere.

Uit de literatuur (Nelson et al., 1983; Hoitink & Boehm, 1999) is bekend, dat *R. solani* in de groei en ontwikkeling wordt belemmerd door een smaller spectrum van biologische remmers in vergelijking tot bijvoorbeeld *Pythium*. *Pythium* wordt gecontroleerd door algemene ziekteonderdrukking, bijvoorbeeld door concurrentie met andere micro-organismen om voedingsstoffen, terwijl de remming van *R. solani* het gevolg is van specifieke ziekteonderdrukking. De onderdrukking van *R. solani* wordt dus waarschijnlijk veroorzaakt door specifieke micro-organismen die aanwezig zijn in EM of gestimuleerd worden door EM. Hoitink & Boehm (1999) wijzen erop dat parasitisme van kritisch belang is voor biologische bestrijding van *R. solani*. Blijkbaar resulteerde de toevoeging van Bokashi niet in algemene onderdrukking van grondgebonden ziekten maar in specifieke onderdrukking van *R. solani* in bepaalde gronden.

Besmette gronden. Bij de verschillende behandelingen van de besmette grond werden geen verschillen in ziekteonderdrukking gevonden. Statistische analyse stelde geen verschillen tussen de behandelingen vast. De behandelingen met Bokashi zonder en met EM hadden geen effect op de ziekteonderdrukking in natuurlijk besmette gronden.

Myceliumgroei test. De diameter van het mycelium was zoals verwacht groter op de gesteriliseerde gronden in vergelijking met de verse gronden. In de gesteriliseerde gronden was geen competitie om beschikbare voedingsstoffen van micro-organismen met de *Fusarium*. Voor zowel de verse als gesteriliseerde gronden werden tussen de beide Bokashi-behandelingen en de controle verschillen vastgesteld. Voor de verse gronden was de myceliumgroei significant groter voor de gecombineerde Bokashi behandeling t.o.v. de controle. Dit bewijst dat de verrijking van de gronden met Bokashi niet resulteert in een schimmelonderdrukkend effect, maar juist een groeistimulerend effect op *F. oxysporum* bewerkstelligt. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de Bokashi-behandelingen met en zonder EM. Voor de gesteriliseerde gronden was de myceliumgroei significant kleiner voor de gecombineerde Bokashi-behandeling t.o.v. de controle, maar de verschillen tussen de afzonderlijke behandelingen waren relatief klein (zie figuur 18). Hierdoor werden er geen significante verschillen gevonden tussen de Bokashi-behandelingen met en zonder EM, waardoor er geen duidelijk effect van de toevoeging van EM-Bokashi op schimmelgroei remming kon worden aangetoond. Dit impliceert dat er geen schimmelonderdrukkend effect van EM tegen *F. oxysporum* uitgaat.

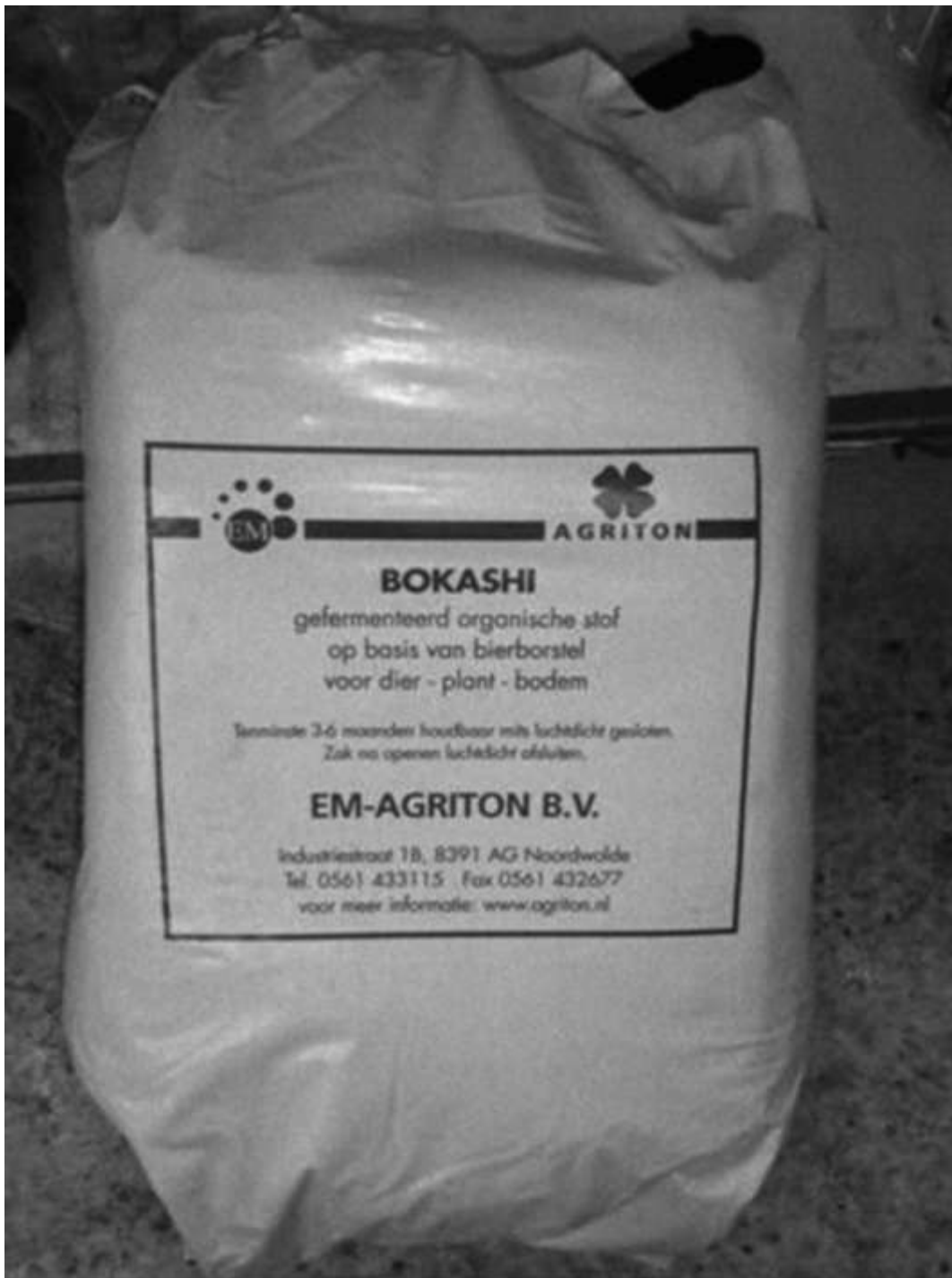
5.4. Grondanalyses

Bodemademhalingstest. Er waren grote verschillen tussen de Bokashi-behandelingen en de controle voor de verse gronden. Net als in de *P. ultimum* biotoets, werd het verschil veroorzaakt door de toevoeging van organisch materiaal (Bokashi). Er waren geen verschillen tussen de behandelingen met gesteriliseerde Bokashi en EM-Bokashi. Voor de rijpe gronden had de gecombineerde Bokashi-behandeling een grotere CO₂-productie dan de controle, maar er waren geen verschillen tussen de gesteriliseerde Bokashi en EM-Bokashi behandelingen. Na acht weken diende de Bokashi nog steeds als een extra voedingsbron voor de micro-organismen in de bodem. Er werd geen significant verschil in bodemademhaling vastgesteld tussen de Bokashi-behandelingen. Hieruit mag niet worden afgeleid dat de samenstelling van de bodemmicroflora niet veranderd was. Mogelijk hebben de micro-organismen in EM een deel van de natuurlijk aanwezige grondbacteriën vervangen. In dat geval zou de totale CO₂-productie niet significant verschillen, maar het is waarschijnlijker dat de EM is weggeconcentreerd door de oorspronkelijk aanwezige microflora.

Bacteriële soortensamenstellingstest. Tussen de EM-A suspensies die op verschillende tijden werden aangeleverd, werden verschillen vastgesteld. Het uitgangsmateriaal is dus niet uniform. In het onderzoek van Van Vliet et al. (2006) werd hetzelfde vastgesteld; twee EM-partijen verschilden in aantal banden en diversiteitsindex. Het gevolg is dat er variatie zal optreden in het resultaat van behandelingen met de EM, afhankelijk van de kwaliteit van het uitgangsmateriaal. De EM-Bokashi had een grotere bacteriële diversiteit dan de EM-A suspensies. De overeenkomst tussen de bacteriesoorten tussen de EM-A en EM-Bokashi was klein, wat aangeeft dat er een verschil in bacteriesamenstelling was tussen beide producten. De poging om zelf EM-Bokashi te maken was niet succesvol; er vestigden zich geen EM in het te fermenteren plantenmateriaal. Er werden slechts kleine verschillen gevonden tussen de "Bokashi" met en "Bokashi" zonder EM.

Kenmerkende bandjes van de EM-A suspensie werden niet teruggevonden in het zelfgemaakte resultaat met EM.

Er werden geen verschillen gevonden in bacteriesamenstelling in de verschillend behandelde grondmonsters. Dit wijst erop dat EM niet in staat was om de bacteriesamenstelling significant te veranderen op een detecteerbaar niveau. Zelfs tussen de bulkgrondmonsters direct genomen na mengen werden geen verschillen waargenomen, dus waarschijnlijk werden de EM micro-organismen direct toegevoegd onder het detectieniveau. Dit verklaart tevens de resultaten van het grootste deel van de biotoetsen, waarin geen invloed van EM werd waargenomen. Alleen één biotoets met *Rhizoctonia solani* vertoonde een ziekteonderdrukkend effect door EM. De bacteriële soortensamenstellingstest bepaalde dat toevoeging van EM niet resulteerde in een verandering van de bacteriële microflora in de grond, dus de toename in ziekteonderdrukking van *R. solani* werd waarschijnlijk niet veroorzaakt door veranderde bacteriële populaties. Mogelijk hebben niet-bacteriën aanwezig in EM bokashi, zoals schimmels en gisten, een verandering in de bodem-microflora veroorzaakt, die geresulteerd heeft in onderdrukking van *R. solani*.



6. Algemene conclusies en aanbevelingen

EM-A had geen duidelijk effect op het verloop van het composteerproces, noch op het organisch stof gehalte en de nutriëntengehaltes van de geproduceerde compost. EM zou misschien een effect kunnen hebben op de compostering en het uiteindelijke product in grotere composthoven die regelmatig gekeerd worden. Voor kleine tuinders zoals de leden van Velt is dit moeilijk te bewerkstelligen, en de effecten van EM op hun kleine composthoven is waarschijnlijk verwaarloosbaar klein. Bovendien is het biologisch geproduceerd plantenmateriaal dat door Veltleden gebruikt wordt als uitgangsmateriaal voor de compostering van zich zelf waarschijnlijk al rijk genoeg aan diverse micro-organismen. Het is wel belangrijk om te proberen de luchttoevoer in de composthoven te verbeteren, zodat de temperatuur minder hoog oploopt.

EM toegevoegd in Bokashi vertoonde meestal geen ziekteonderdrukkend effect, behalve voor *Rhizoctonia solani* in één van de gronden. EM verhoogde dus niet de algemene ziekteonderdrukking van de gebruikte gronden. Toevoeging van Bokashi stimuleerde zelfs de ontwikkeling van *Pythium ultimum* in sommige gevallen. Toevoeging van EM had geen effect op de ziekteontwikkeling op de besmette gronden.

Onderdrukking van *R. solani* door EM in één van de gronden duidt op specifieke onderdrukking. Ook in eerder onderzoek werd bewezen dat EM van invloed was op *R. solani* (Innoventis, 2002). De oorzaak van het ziekteonderdrukkend effect in dit experiment is onbekend, maar waarschijnlijk is het effect het gevolg van specifieke onderdrukking door bepaalde soorten micro-organismen in de EM-Bokashi of gestimuleerd door dit product.

Toevoeging van levende EM organismen aan de Velt-gronden bracht geen significante verandering van de bacteriesamenstelling teweeg en verhoogde ook niet de bodemademhaling. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat andere micro-organismen dan bacteriën die aanwezig zijn in de EM zoals schimmels en gisten, verantwoordelijk zijn voor het ziekteonderdrukkend effect op *R. solani*. De myceliumgroeitest toonde aan dat er geen schimmelremmend effect van EM op *Fusarium oxysporum* is. Het zou interessant zijn om de myceliumgroei van *R. solani* op dezelfde wijze te toetsen. Het zou ook interessant zijn om meer experimenten met EM en *Rhizoctonia solani* uit te voeren, om zo te kunnen onderzoeken voor welke gewassen en onder welke omstandigheden EM een ziekteonderdrukkend effect vertoont. Het mechanisme van ziekteonderdrukking van *R. solani* dient ook te worden opgehelderd. Een soortensamenstellingstest specifiek gericht op bijvoorbeeld bodemschimmels zou interessant zijn om te achterhalen of deze micro-organismen verantwoordelijk zijn voor de toegenomen ziekteonderdrukking van *R. solani*. De uitgevoerde experimenten vestigen de aandacht op drie van de meest algemene grondgebonden schimmels: *Pythium*, *Rhizoctonia* en *Fusarium*. Toegevoegd onderzoek zou kunnen worden uitgevoerd om de effecten van EM op andere grondgebonden schimmelziekten, grondgebonden bacterieziekten of plantparasitaire nematoden te bepalen. Tevens zouden de effecten van EM op bladziekten kunnen worden onderzocht.

De resultaten van het *P. ultimum* – komkommerexperiment en de bodemademhalingstest toonden aan dat toevoeging van Bokashi niet alleen het bodemleven in het algemeen stimuleert, maar mogelijk ook de ontwikkeling van sommige plantpathogenen. Indien de gronden een aantal weken na verrijking met Bokashi onaangeroerd waren gebleven, zodat de effectieve micro-organismen zich konden vestigen en een nieuw evenwicht konden bereiken met de gevestigde microflora, dan zouden misschien andere resultaten zijn verkregen. Aanvullend onderzoek is nodig om te bepalen wat de meest effectieve manier is om EM (vloeibaar EM-A, Bokashi of een combinatie van beide) toe te passen en welke EM concentratie optimaal is om problemen veroorzaakt door bodemgebonden plantpathogenen te verminderen. Stabieler organisch materiaal zou kunnen dienen als een beter substraat voor het maken van Bokashi. Voor de producenten voor EM is het van belang om uniform uitgangsmateriaal van constante kwaliteit te leveren. Anders zullen de effecten van EM niet duidelijk en betrouwbaar zijn voor tuiniers, boeren en onderzoekers. Tevens zijn betere richtlijnen nodig voor het thuis produceren van Bokashi.

Dit onderzoek heeft, evenals voorgaand onderzoek, aangetoond dat de resultaten van het gebruik van EM zeer variabel kunnen zijn, afhankelijk van de werkelijke microbiële samenstelling van het EM product, de grond, de plantensoort en de pathogenen. Veltleden kunnen natuurlijk zelf besluiten of zij EM producten willen gebruiken. Het is echter wetenschappelijk aangetoond dat biologisch

beteelde gronden van zich zelf al ziekteonderdrukkend zijn, mede door een grote diversiteit aan micro-organismen (van Bruggen en Termorshuizen, 2003). Het is dan ook twijfelachtig of het onderdrukkend vermogen verbeterd kan worden door toevoeging van gekweekte micro-organismen aan een toch al zeer rijke bodem (Hiddink et al., 2005).

7. Literatuur

Agriton, 2006. Het EM Agriton systeem voor een gezonde tuinbouw. Noordwolde, The Netherlands.

Aryantha, N.P. & Guest, D.I. 2000. Bokashi (EM) as a bio-control agent to suppress the growth of *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings of the 5th International Conference on Kyusei Nature Farming and EM Technology. Beijing, China.

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16: 729-770.

Blok, W.J. & Bollen, G.J. 1996. Interactions of asparagus root tissue with soil microorganisms as a factor in early decline of asparagus. *Plant Pathology* 45: 809-822.

Borgen, A. 1997. Effects of seed treatments with EM in control of common bunt (*Tilletia tritici*). Proceedings of the 5th International Conference on Kyusei Nature Farming and EM Technology. Beijing, China.

Breeuwsma, S. & de Boer, M. 2004. Toetsing van het Bokashi/EM concept tegen *Pythium* wortelrot in hyacinth. Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. Lisse, The Netherlands.

Craft, C.M. & Nelson, E.B. 1996. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1550-1557.

De Vos, O.J. 2007. DGGE of PCR products protocol. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Engelen, B., Meinken, K., Von Witzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H. & Backhaus, H. 1998. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2814-2821.

Formowitz, B., Elango, F., Okumoto, S., Mueller, T., & Buerkert, A. 2007. The role of "effective microorganisms" in the composting of banana (*Musa* ssp.) residues. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 649-656.

Garbeva, P., Van Veen, J.A. & Van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review Phytopathology* 42: 243-270.

Gobat, JM., Aragno, M. and Matthey, W. 2004. The living soil, fundamentals of soil science and soil biology. Science publishers, Enfield, USA: 33-40.

Hervas, A., Trapero-Casas, J. & Jimenez-Diaz, R. 1998. Effects of commercial and indigenous micro-organisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13: 166-176.

Hiddink, G.A., van Bruggen, A.H.C., Termorshuizen, A.J., Raaijmakers, J.M., & Semenov, A.V. 2005. Effect of organic management of soils on suppressiveness to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and its antagonist, *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Plant Pathology* 113: 417-435.

Higa, T. & Parr, J.F. 1994. Beneficial and effective micro-organisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Centre, Atami, Japan.

Higa, T. 1998. Effectieve micro-organismen, voor een duurzame landbouw en een gezond milieu. Translated from English. Jan van Arkel, Utrecht, The Netherlands. 131-191.

Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A. & van Vark, W. 1999. Soil analysis procedures; extraction with 0.01 M CaCl₂. Practical handbook. Wageningen University, The Netherlands. 12-18, 21-23, 52-54.

Hoitink, H.A.J. & Fahy, P.C. 1986. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. *Annual Review Phytopathology* 24: 93-114.

Hoitink, H.A.J. & Boehm, M.J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review Phytopathology* 37: 427-446.

Innoventis, 2002. Rhizoctoniabestrijding aardappelen (late toepassing) 2002 (unpublished). Via: www.agriton.com.

Kulik, M. 1996. Biological control: actinomycetes, cyanobacteria and algae. US Department of Agriculture, Beltsville, USA. In: Sneh et al. 1996. Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 463-473.

Larkin, R. & Fravel, D. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial bio-control organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Disease* 82: 1022-1028.

Lazarovitz, G. 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 1-7.

Lee, K.H. & Cho, S.D. 1993. Effect of EM and EM-fermented compost on the growth and yield of rice and vegetable crops in Korea. Proceedings of the 3rd international conference of Kyusei Nature Farming. Santa Barbara, California, USA.

Mazzola, M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soil-borne diseases. *Biomedical and Life Sciences* 81: 557-564.

Mathre, D.E., Cook, R.J., Callan, N.W. 1999. From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. American Phytopathology Society. *Plant Disease* 83: 972-983.

Merfield, C.N., Walter, M. & Daly, M.J. 1998. The biological control of pea root rot and damping off on lettuce by effective micro-organisms. Proceedings of the 6th conference of efficient micro-organisms. Sara Buri, Thailand.

Mousseaux, M.R., Dumroese, R.L.J., Wenny, D.L. and Knudsen, G.R. 1998. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control of *Fusarium oxysporum* in container-grown Douglas-fir seedlings. *New Forests* vol. 15, 11-21.

Mupondi, L. T., Mnkeni, P. N. S., & Brutsch, M. O. 2006. The effects of goat manure, sewage sludge and effective microorganisms on the composting of pine bark. *Compost Science & Utilization* 14: 201-210.

Nelson, E.B., Kuter, G.A., Hoitink, H.A.J. 1983. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73: 1457-1462.

Parr, J.F., Hornick, S.B. and Kaufman, D.D. 1994. Use of microbial inoculants and organic fertilizers in agricultural production. Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture Beltsville, Maryland, U.S.A.

- Ryder, M.H. and Rovira, A.D. 1993. Biological control of take-all of glasshouse-grown wheat using strains of *Pseudomonas corrugate* isolated from wheat field soil. *Soil Biology & Biochemistry* 25: 311-320.
- Tanii, A., Takeuchi, T. and Horita, H. 1990. Biological control of scab, black scurf and soft rot of potato by seed tuber bacterization. 143-164. In: D. Hornsby. Biological control of soil-borne plant pathogens. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 1998. Microbiology, an introduction. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park, USA. 295-316.
- Van Bruggen, A.H.C., & Termorshuizen, A.J. 2003. Integrated approaches to root disease management in organic farming systems. *Australasian Plant Pathology* 32: 141-156.
- Van den Boogert, P., Jager, G. and Velvis, H. 1990. *Verticillium biguttatum*, an important mycoparasite for the control of *Rhizoctonia solani* in potato. 77-91. In D. Hornsby. Biological control of soil-borne plant pathogens. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Van Egeraat, A.W.S.M. 1998. EM1 en de groei van micro-organismen (unpublished). Via: www.agriton.nl.
- Van Elsas, J.D. & Heijnen, C.E. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 10: 127-133.
- Van Rijn, E., Termorshuizen, A.J., Blok, W.J., Spyropoulos, V. 2007. Compost-induced suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum* is host and compost dependent. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of micro-organisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 121-135.
- Van Vliet, P.C.J., Bloem, J., de Goede, R.G.M. 2006. Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition on Effective Micro-organisms® (EM) to slurry manure. *Applied Soil Ecology* 32: 188-198.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology* 26: 379-407.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B. and Thomashow, L.S. 2002. *Annual Review Phytopathology* 40: 309-348.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Xu, H.L., Wang, R., Mridha, M.A.U. and Umemura, U. 1999. *Phytophthora* resistance of tomato plants grown with EM bokashi. Proceedings of the 6th International Conference of Kyusei Nature Farming, 259-264. Pretoria, South Africa.

Bijlage 1. Specificaties van de gebruikte gronden

Grond	N-totaal oplosbaar mg/kg	K mg/kg	P-fosfaat mg/kg	Organisch materiaal %
1. Frans Delie	109.7	208	24.50	5.72
2. Velt-links	77.4	132	25.00	6.28
3. R Meulemans	127.7	178	19.60	13.52
4. Droevendaal1	37.8	29.6	4.90	3.47
5. Heemtuin	50.5	19.6	1.60	4.69
6. Proeftuin	30.4	83.6	13.20	4.65
7. Velt-mengsel	79	108	12.00	5.90
8. Droevendaal2	25.2	30.4	3.20	3.17
9. Potgrond	785.25	862.5	141.00	57.61

Gronden 1, 2, 3, 7 en 8 zijn onbesmet (gezonde gronden) en gronden 4, 5 en 6 zijn van nature besmet (zieke gronden).

Grondgebruik per experiment

Pythium ultimum – komkommer biotoets : grond 7, 8, 9
 Rhizoctonia solani – peen biotoets : grond 1, 2, 3
 Natuurlijk besmette gronden experiment : grond 4, 5, 6
 Mycelium groeitest : grond 1, 2, 3
 Bodemademhalingstest : grond 1, 3, 7, 8
 Bacteriële soortensamenstellingstest : grond 1, 3

Wetenschapswinkel Wageningen UR



Wetenschapswinkel Wageningen UR

De Wetenschapswinkel is een onderdeel van Wageningen Universiteit en Researchcentrum. Allerlei maatschappelijke organisaties, actiegroepen of verenigingen kunnen hier terecht met een vraag of probleem op het werkterrein van Wageningen UR.

Voor meer informatie kunt u contact opnemen met:

Wetenschapswinkel Wageningen UR

Postbus 9101
6700 HB Wageningen
tel. (0317) 48 39 08
fax (0317) 48 44 49
e-mail: wetenschapswinkel@wur.nl

Ook kunt u op de website kijken:
www.wetenschapswinkel.wur.nl