



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Afforesting with microbes: disentangling the effects of soil biotic and abiotic characteristics on trees using soil inoculation

Georgopoulos, K.

Citation

Georgopoulos, K. (2025, November 19). *Afforesting with microbes: disentangling the effects of soil biotic and abiotic characteristics on trees using soil inoculation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4283446>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4283446>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Het omvormen van voorheen onbebost land tot bos via bebossing (herbebossing) zet een reeks veranderingen in de bodemomgeving in gang. Deze veranderingen beïnvloeden niet alleen de chemische en fysische eigenschappen van de bodem, maar ook de levende componenten. Naarmate de bodem verandert, verschuift ook de samenstelling van de microbiële gemeenschappen rond de boomwortels. Dit kan invloed hebben op de gezondheid van bomen, interacties met herbivoren boven de grond, en vitale ecosysteemprocessen zoals nutriëntenkringlopen en gasuitwisseling. Nu bebossing een centrale strategie is in natuur herstelprojecten — en methoden zoals bodeminoculatie steeds vaker worden ingezet om gedegradeerde ecosystemen te herstellen — wordt het steeds belangrijker om te begrijpen hoe deze veranderingen ondergronds doorwerken in het bredere systeem. Tot nu toe is er in het onderzoek vaak gekeken naar bodemveranderingen als geheel, zonder dat de rol van levende organismen en abiotische bodemkenmerken is onderscheiden. Deze thesis vult die leemte op door onder gecontroleerde omstandigheden biotische en abiotische bodemcomponenten experimenteel te isoleren, om beter te begrijpen hoe elk van deze factoren de groei van bomen, microbiële associaties en bredere ecologische interacties beïnvloedt.

In Hoofdstuk 2 onderzoek ik hoe abiotische en biotische bodemeigenschappen van bossen veranderen in de loop van een herbebossingschronosequentie. Specifiek kijk ik welke abiotische kenmerken, typisch voor elke bosleeftijd, de samenstelling verklaren van bepaalde functionele groepen van schimmels, bodemdieren en bacteriën. We verzamelden bodem en wortels van drie akkers en twaalf beboste percelen (met een leeftijd van ongeveer 10, 15, 25 en meer dan 100 jaar) en registreerden de bedekking van het bladerdek. In het lab analyseerden we de standaard bodemkenmerken en nutriëntenconcentraties in de bodem en we bepaalden de sequentiebepaling van DNA uit de bodem om de samenstelling van de bodemgemeenschappen te bepalen. Zoals verwacht veranderde herbebossing de bodemomstandigheden, met een hoger gehalte organische stof (SOM), een lagere bulkdichtheid en een lagere pH in oudere bossen. Verrassend genoeg waren de NO_3 -concentraties hoger in volwassen bossen dan in akkers. Schimmeldgemeenschappen verschoven van meer pathogene en meer saprotrofe soorten in akkers naar ectomycorrhiza-gedomineerde gemeenschappen in oudere bossen. Ook de samenstelling van bodemdieren veranderde: sequenties van regenwormen namen toe, terwijl sequenties van nematoden en geleedpotigen

afnamen. Bij bacteriën nam het geslacht *Frankiales* toe met de leeftijd van het bos, wat mogelijk de onverwachte toename van NO_3 die we waarnamen verklaart. De gemeenschappen werden grotendeels bepaald door de pH in de bodem (schimmels), door SOM (bodemdieren), en door een combinatie van bladerdek, worteleigenschappen en nutriëntenbeschikbaarheid (bacteriën). In tegenstelling tot wat we verwachtten, nam de rijkdom aan schimmels en bodemdieren af over tijd en was deze was laag in volwassen bossen. Over het geheel genomen vertoonden alle bodemgemeenschappen geleidelijke, maar parallelle verschuivingen van akkerland naar referentiebos, in plaats van het verwachte tragere verloop bij schimmels en bodemdieren.

In Hoofdstuk 3 onderzoek ik hoe biotische en abiotische kenmerken van bosbodems de groei van *Alnus glutinosa* (zwarte els) en de vraat door herbivoren beïnvloeden tijdens vroege stadia van herbebossing. Bodems werden verzameld uit bossen van verschillende leeftijden (10, 15 en 25 jaar oud) met bomen die op voormalige landbouwgronden waren aangeplant. Twee experimenten werden uitgevoerd om de effecten van het bodemmicrobioom (levende versus gesteriliseerde bodem, en geïnoculeerd versus niet-geïnfecteerde bodem) en bosleeftijd te beoordelen op boomgroei, wortel-geassocieerde microbiële gemeenschappen en bladvraat door rupsen (*Mamestra brassicae*). Tegen verwachting in presteerden bomen in levende bodem niet beter dan in gesteriliseerde bodem — waarschijnlijk door vrijgekomen nutriënten en het ontbreken van microbiële competitie in de gesteriliseerde bodems. In 10 jaar oude bodems hadden de zaailingen dunnere stammen in gesteriliseerde bodem, terwijl ze in oudere bodems juist dikkere stammen en minder fijne wortels hadden in gesteriliseerde omstandigheden — wat duidt op een leeftijdsafhankelijke respons. Hoewel de microbiële samenstelling van de wortels niet significant verschilde tussen bosleeftijden, waren *Streptomyces* en *Rokubacteriales* talrijker in 15 jaar oude bodems en positief gecorreleerd met bovengrondse biomassa. De insectenvraatproef met rupsen liet een positieve correlatie zien tussen bladstikstofgehalte en vraat in de gesteriliseerde bodems. Zaailingen in 10 jaar oude bodems ondergingen de meeste vraat, wat wijst op grotere kwetsbaarheid in vroege herbebossingsstadia. Toch verschilden levende en gesteriliseerde behandelingen hierin niet. Verrassend was ook dat de dichtheid aan *Frankia alni*-knobbeltjes in de wortels afnam met de bosleeftijd.

In Hoofdstuk 4 bestudeer ik hoe verschillende groottefracties van bodemorganismen uit jonge en volwassen bossen de groei van *A. glutinosa*, wortel-geassocieerde

microbiële gemeenschappen en broeikasgasfluxen beïnvloeden. Een mesocosmos-experiment werd uitgevoerd met bodemfracties (250, 20, 11 en 3 μm) gescheiden via het nat zeven van de bodems. De samenstelling van de wortelgeassocieerde gemeenschappen in de zaailingen werd bepaald door bosleeftijd, maar niet door de groottefractie van het inoculum. Hoewel ik verwachtte dat een lagere diversiteit van bodemorganismen negatieve effecten zou hebben op de groei van de zaailingen, bleek dat juist inoculatie met de grootste fractie uit volwassen bossen de groei verminderde — vermoedelijk door verhoogde competitie voor voedingsstoffen tussen zaailingen en het bodemleven. Tot mijn verbazing werden de broeikasgasfluxen niet significant beïnvloed door bosstadium of bodemfractie.

In Hoofdstuk 5 onderzoek ik, naar aanleiding van de verrassende resultaten in **Hoofdstukken 3 en 4**, hoe microbiële gemeenschappen uit jonge en volwassen bossen, evenals stikstof- (N) en fosfor- (P) beschikbaarheid, de knolvorming door *F. alni* en de prestaties van *A. glutinosa* beïnvloeden. In een mesocosmos-experiment werden zaailingen geïnoculeerd met bacteriën, schimmels of beide, gekweekt uit bosbodems, met of zonder toevoeging van *F. alni* bacteriën. Ook werden gecontroleerde nutriëntenmanipulaties uitgevoerd. Schimmelgemeenschappen uit volwassen bossen onderdrukten het groeibevorderende effect van *F. alni*, hoewel de biomassa van de wortelknolletjes zelf niet afnam. Specifieke bacteriën en schimmels met een remmende werking werden geïsoleerd en geïdentificeerd. Verhoogde N-beschikbaarheid verlaagde significant de knolbiomassa, wat wijst op een drempelwaarde waarboven symbiose minder nodig is. P-toevoeging daarentegen verhoogde zowel knolvorming als boomgroei. Deze resultaten tonen aan dat microbiële gemeenschappen — vooral in oudere bossen — de voordelen van *F. alni* kunnen beïnvloeden en dat de beschikbaarheid van voedingsstoffen in de bodem cruciaal is voor het vormgeven van deze symbiose.

In Hoofdstuk 6 onderzoek ik het gebruik van NIR-spectroscopie om symbiotisch gefixeerde stikstof te onderscheiden van stikstof dat planten opnemen uit de bodem voor *A. glutinosa*, met behulp van de bemestingsexperimenten uit **Hoofdstuk 5**. Zaailingen werden gekweekt onder gecontroleerde omstandigheden, met een stikstofgradiënt en al dan niet *F. alni*-inoculatie. De groei en gezondheid van de zaailingen werden gemeten via bladchlorofylgehalte, biomassa en spectrale reflectie. PCA- en PLS-analyse toonden duidelijke spectrale verschillen tussen *F. alni*-geïnfecteerde en bemeste planten, vooral in het zichtbare spectrum. Opvallend

genoeg imiteerde hoge N-bemesting wel de groeieffecten van symbiotische fixatie, maar NIR-spectroscopie onthulde lagere reflectie in *F. alni*-planten, iets wat niet zichtbaar was in de SPAD-chlorofylmetingen. Dit toont aan dat NIR-spectroscopie potentie heeft als snelle, niet-destructieve methode om stikstoffixatie in bomen te beoordelen — nauwkeuriger dan traditionele methoden.

Concluderend toont deze thesis aan dat zowel abiotische bodemeigenschappen als microbiële bodemgemeenschappen een belangrijke rol spelen in de groei van bomen, stikstofbindende symbiose en ecosysteemprocessen tijdens herbebossing. In plaats van ervan uit te gaan dat een grotere microbiële diversiteit altijd herstel bevordert, onderstrepen de bevindingen het belang van context-specifieke strategieën voor bodeminoculatie. Vooral voor stikstofbindende soorten zoals *Alnus glutinosa* kan de samenstelling en herkomst van microbiële gemeenschappen het verschil maken tussen versnelde groei of onderdrukte symbiose. Hoewel de effecten op vraatschade door insecten en op broeikasgassen beperkt waren, kunnen subtiele ondergrondse interacties — vooral rond stikstoffixatie — alsnog betekenisvolle bovengrondse gevolgen hebben. Deze inzichten benadrukken het belang van het integreren van microbiële ecologie in bebossingsstrategieën, niet als een universele oplossing, maar als een gericht instrument voor het bevorderen van veerkrachtige, multifunctionele ecosystemen. Vooruitkijkend zijn langdurige veldstudies, locatieoverschrijdende vergelijkingen en onderzoek naar een bredere reeks boomsoorten essentieel om deze bevindingen om te zetten in effectieve en opschaalbare herstelpraktijken.