



RANOX
natuuraannemer

Onderzoeksrapport

Proef bestrijding Aziatische duizendknoop
Keijenberg Wageningen

Status	Definitief
Datum	22 juli 2020
Rapportagenummer	RA19002-01
Auteur	Arthur Hoffmann
Collegiale toets	Johannes Regelink

1. Aanleiding

Verscheidende soorten Aziatische duizendknopen zijn gekenmerkt als een invasieve exoot. Door hun grote kiemkracht keren deze soorten terug op plekken waar bestrijding heeft plaatsgevonden en leidt dit tot hoge terugkerende beheerskosten.

Bodem resetten is een biologische techniek die in de teelt van gewassen wordt ingezet om schimmels, ziekten, insecten en onkruid te bestrijden. Doordat een eiwitrijk preparaat (Herbie-korrels) onder anaerobe omstandigheden de vermeerderingen van anaerobe bacteriën stimuleert vindt een plotselinge verandering van aanwezig bodemleven plaats. Dit zorgt ervoor dat diverse aanwezige dominante ziekteverwerkers en wortels van onkruiden worden gedood.

De vraag was of deze techniek ook ingezet kan worden om ongewenste invasieve exoten, waaronder bijvoorbeeld Aziatische duizendknopen, op een biologische wijze te bestrijden.

Om die vraag te beantwoorden heeft RANOX natuuraannemer samen met een aantal partners een proef uitgevoerd. De partners zijn:

- Van de Haar Groep, voor de uitvoering van de werkzaamheden;
- Datura Molecular Solutions, voor de analyse van de DNA-data;
- ThatchTech, voor de levering van de Herbie-korrels en
- Provincie Gelderland, voor de ter beschikking stelling van de locatie.

Stichting Probos kijkt als een externe partij mee.

Deze notitie is een verslag van de werkwijze en de resultaten.

2. Methode

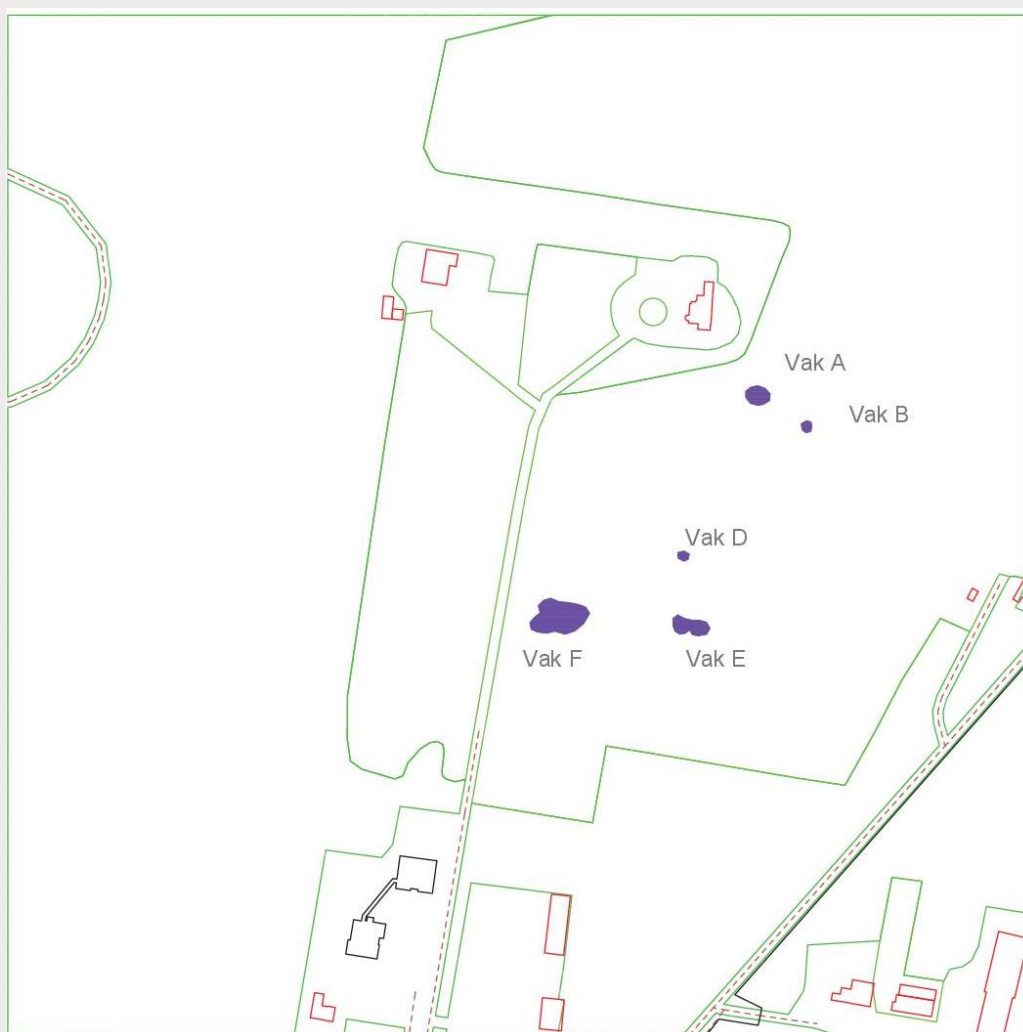
Om de Aziatische duizendknoop te bestrijden worden Herbiekorrels toegepast. Door deze eiwitrijke korrels te vernatten en af te dekken met een luchtdichte folie worden anaerobe omstandigheden gecreëerd, die zorgen voor een bacteriegroei die de wortels van de Aziatische duizendknoop aanvallen. De hypothese is dat in de anaerobe fase de kiemcellen van de vegetatie worden vernietigd, waarna in de aerobe fase te vertering van de plantenresten plaatsvindt.

2.1 Proeflocatie

De proeflocatie is een voormalige vuilstortplaats “De Keijenberg” in Wageningen, die door de Provincie Gelderland beheerd wordt. De voormalige vuilstortplaats is afdekt met een folie en ongeveer één meter grond. Op de vuilstortplaats zijn enkele vlakken met Aziatische duizendknoop aanwezig. Gezien de overzichtelijke plots met Aziatische duizendknoop en het afgesloten terrein is de vuilstortplaats een geschikte locatie om als proeflocatie te dienen voor het bestrijden van Aziatische duizendknoop middels anaerobe bacteriën.

In het plangebied zijn in eerste instantie 6 proefvlakken geselecteerd. Deze zijn gelabeld van A tot F. De proefvlakken A, D en F zijn behandeld met Herbie-korrels, de proefvlakken B en E zijn controle vlakken. Proefvlak C is bij ander inzien komen te vervallen omdat hier al een andere bestrijdingsmethode werd getest.

De proefvlakken zijn van verschillende grootte. De behandelde proefvlakken A, D en F zijn respectievelijk 85, 18 en 351 m² groot. De controlevlakken B en E hebben een oppervlakte van respectievelijk 21 en 117 m².



Figuur 1 Ligging en verspreiding van de vijf proefvlakken binnen het onderzoeksgebied Keijenberg.

2.2 Uitgevoerde maatregelen

In december 2018 zijn de proefvlakken ingemeten en geselecteerd (Figuur 2). De proef is gestart op 6 mei 2019. Achtereenvolgens zijn de volgende stappen toegepast:

- Maaien. De aanwezige vegetatie van Aziatische duizendknoop is met een bosmaaier kort gemaaid. De controlevakken zijn niet gemaaid.
- Harken en afvoeren. Het maaisel is bijeengeharkt en vervolgens afgevoerd.
- Herbie korrels uitstrooien. De proefvlakken A, D en F zijn behandeld met de Herbie-korrels. In totaal is 1.000 kilogram Herbie toegepast. Dit komt neer op ongeveer 2.200 gram per m². (Figuur 4)
- Frezen. De Herbie korrels zijn met behulp van een frees tot 25 cm diepte door de bodem gemengd.
- Nat maken. De gefreesde bodems zijn met oppervlaktewater natgespoten. Er is 30 m³ water gebruikt, wat neerkomt op ongeveer 66 liter per m². (Figuur 6)
- Luchtdicht folie plaatsen. De bodems zijn afgedekt met een extreem luchtdichte folie. Het type folie is een totally impermeable film (TIF), transparant, 30 micron dik, met een zuurstof

doorlaatbaarheid van < 20 eenheden OTR (Oxygen Transmission Rate). De folie is aan de randen van de plots tot 1 meter diepte ingegraven. (Figuur 8)

- Afdekken met landbouwplastic. Ter bescherming tegen licht en om te voorkomen dat het folie scheurt of door vogels beschadigd raakt, is een zwarte kuil folie (PE geschat 150 micron dik) als tweede laag toegepast.
- Proefvlakken zijn omheind met paaltjes en glad draad om ze af te schermen van regulier maai-beheer op de vuilstortplaats.

De proefvlakken zijn gedurende een periode van 5 maanden afgedekt gebleven. Op 30 september 2019 is het folie verwijderd en is de bodem visueel geïnspecteerd op de aanwezigheid van wortelresten. De proefvlakken zijn vervolgens ingezaaid met een HEEM-mengsel, bestaande uit inheemse soorten. In tabel 1 is de specificatie van het toegepaste mengsel opgenomen.

Nederlandse naam	Gram
Aardaker	6
Avondkoekoeksbloem	5
Boerenwormkruid	2
Donzige klit	2
Duizendblad	5
Fluitenkruid	8
Gewone agrimonie	16
Gewone berenklauw	12
Gewone margriet	15
Gewoon biggenkruid	8
Glad walstro	5
Grote kaardebol	2
Grote klaproos	4
Knoopkruid	15
Korenbloem	4
Middelste teunisbloem	4
Pastinaak	5
Peen	5
Reukeloze kamille	5
Rode klaver	10
Sint-Janskruid	4
Vlasbekje	5
Wilde cichorei	15
Zeepekruid	10
Zwarte toorts	8

Tabel 1. Specificatie van het toegepaste zadenmengsel van inheemse plantensoorten, geleverd door HEEM.

Op 7 mei 2020 zijn de proefvlakken opnieuw beoordeeld op het opkomen van Aziatische duizendknoop en het zadenmengsel van HEEM.

Een laatste monsternamen van bodemmateriaal voor de DNA-analyse heeft op 7 mei plaatsgevonden.

Gedurende de looptijd van de proef is geen beheer uitgevoerd in de proefvlakken B en E.



Figuur 2. Inmeten van de proeflocatie



Figuur 3. Graven van sleuf aan de rand van proefvlak om folie in te bevestigen.



Figuur 4. Uitstrooien Herbie-korrels op proefvlak F.



Figuur 5. Close-up van Herbie-korrels tussen de Aziatische duizendknoop.



Figuur 6. Natmaken van de proefvlakken.



Figuur 7. Steken van bodemonsters ten behoeve van de DNA-analyse.



Figuur 8. Afdekken van het proefvlak met eerst een luchtdicht folie en vervolgens een landbouwfolie.

2.3 Onderzoekopzet analyse resultaten

2.3.1 Visueel

Op 30 september 2019 zijn na het verwijderen van het folie de proefvlakken A, D en F visueel geïnspecteerd. Hierbij is gekeken of er nog levende Aziatische duizendknopen aanwezig zijn en hoe de vertering van de resten van de dode planten is gevorderd.

Op 7 mei 2020, aan het begin van het groeiseizoen van de Aziatische duizendknoop is opnieuw een opname gemaakt van opgekomen Aziatische duizendknoop. Daarmee wordt een indruk verkregen van de effectiviteit van de toegepaste methode.

2.3.2 DNA-analyse

Van alle vijf de vakken (Vak A, B, D, E en F) zijn bodemonsters genomen. Dit heeft plaatsgevonden op de dag van de start van uitvoering op 6 mei 2019 en op de dag van het weghalen van het afdekzeil op 30 september. Bij de start van het nieuwe groeiseizoen op 7 mei 2020 is een derde en laatste keer een monster genomen worden.

Bemonstering vond plaats conform het standaard protocol van het Adviesloket Bodem en Natuur. De bodemonsters worden door middel een metabarcoding-techniek geanalyseerd op aanwezigheid van het bodemleven.

De bodemmonsters zijn door Datura Molecular Solutions onderzocht op de aanwezigheid van alle mogelijke levensvormen met behulp van (e)DNA metabarcoding. In het kort komt de techniek op het volgende neer: DNA van het bodemleven dat in de bodem aanwezig is, zogenaamd *environmental DNA* (eDNA), wordt in het laboratorium geïsoleerd. Vervolgens wordt het eDNA met behulp van PCR vele keren gekopieerd tot een hoge DNA concentratie. Hierbij worden 'primers' gebruikt die speciaal door Datura Molecular Solutions zijn ontwikkeld. Deze primers hechten aan het specifiek deel van het DNA, dat ook wel een 'marker' genoemd wordt.

Deze primers vermeerderen een kort fragment van het eDNA dat aanwezig is, waardoor het makkelijker te analyseren is. Bij het uitlezen, sequencen genaamd, worden miljoenen stukjes van het eDNA vertaald in digitale code. Het uitgelezen eDNA resulteert in een enorm grote ruwe dataset. Met krachtige computers wordt de ruwe data opgeschoond en volgen er verschillende kwaliteitschecks. Daarna worden vele families, geslachten en soorten bodemleven geïdentificeerd aan de hand van referentie databases. De laatste stap bestaat uit het indelen van de gevonden soorten in 'functionele groepen'. Het resultaat van de analyse is semi-kwantitatief: van iedere gedetecteerde 'soort' is het aandeel eDNA bepaald ten opzichte van de totaal aanwezig hoeveelheid eDNA.

In dit onderzoek zijn er twee primers gebruikt, een universele primeren een 'eukaryoten primer'. Met de universele primer kunnen in principe alle soorten die in de bodem voorkomen in kaart gebracht worden; van bacteriën tot regenwormen. Met deze universele primer wordt er een globaal beeld verkregen van de organismen die in de bodem zitten, met name organismen die talrijk voorkomen of hoge concentraties DNA hebben achtergelaten. Bij het gebruik van de universele primer wordt DNA-materiaal dat in lage concentraties aanwezig is, weggedrukt door de hoge DNA concentraties van organismen die talrijk aanwezig zijn, zoals bacteriën. Om ook zeldzamere organismen goed te kunnen detecteren, is er gebruik gemaakt van een eukaryoten primer. Deze hecht zich alleen op het DNA van eukaryoten, zoals schimmels, planten, zoogdieren en insecten. Daarmee kan bijvoorbeeld in kaart worden gebracht welke typen schimmels in de bodem aanwezig zijn en de aanwezigheid van soorten die hoger in de voedselketen staan, zoals protisten en nematoden. Dit geeft vervolgens inzicht in de complexiteit en stabiliteit van het voedselweb en de bodem.

De ruwe DNA data wordt verwerkt tot een spreadsheet met daarin de aantallen DNA uitlezingen per gedetecteerde DNA sequentie. Een unieke DNA sequentie die gedetecteerd is, wordt een OTU (*operational taxonomic unit*) genoemd. Dit kan een soort zijn, maar vaak zullen diverse nauw verwante organisme dezelfde DNA-sequentie dragen. In zo'n geval kan niet vastgesteld worden welke soort het betreft, maar betreft het een groep nauw verwante organismen. De aantallen OTU's geven een goede indicatie voor de diversiteit in het algemeen, of bijvoorbeeld binnen een bepaalde soortgroep.

3. Resultaten

3.1 Veldexperiment

3.1.1 Analyse zuurstofgehalte.

In proefvlak A is de concentratie zuurstof (O₂) en kooldioxide (CO₂) onder de afdekking gemeten. Na 4 dagen was de concentratie O₂ gedaald naar 0,27%. De concentratie CO₂ is op dezelfde tijdspanne gestegen naar 18,13%. Op 1 juni is de concentratie O₂ opnieuw gemeten en was deze nog steeds lager dan 1%. De meting heeft alleen in proefvlak 1 plaatsgevonden. Het ligt voor de hand dat de concentraties O₂ en CO₂ in de proefvlakken D en F vergelijkbaar is.

3.1.2 Ontwikkeling Aziatische duizendknoop

In alle drie de behandelde proefvlakken heeft afsterven van Aziatische duizendknoop plaatsgevonden, in welke mate verschilt per proefvlak.

In proefvlak A is de bodem nagenoeg zuurstofloos geworden. Het folie was bij het verwijderen op 30 september 2019 nog intact. Er heeft afsterven van Aziatische duizendknoop plaatsgevonden over het gehele proefvlak. Direct na verwijderen van het folie zijn op zo'n 2 m² witte wortels gevonden aan een van de zijkanten van het proefvlak, waarschijnlijk van de Aziatische duizendknoop. Daarnaast zijn diverse afgestorven wortels aanwezig. Op 6 mei 2020 zijn op deze proeflocatie geen Aziatische duizendknopen vast gesteld. Blijkbaar waren de zichtbare wortels op 30 september 2019 niet meer levensvatbaar.



Figuur 9. Na het openen van proefvlak A waren hier witte wortels, waarschijnlijk van Aziatische duizendknoop aanwezig. Op 6 mei 2020 was er geen Aziatische duizendknoop meer aanwezig.



Figuur 10. Een van de afgestorven wortels in proefvlak A (beneden), en een levende wortel uit een referentievlak (boven).

In proefvlak D heeft geen analyse van het zuurstofgehalte plaatsgevonden. Omdat dit proefvlak op dezelfde wijze is behandeld als proefvlak A kan er van worden uitgegaan dat de bodem ook hier nagenoeg zuurstofloos is geworden. Het folie was bij het verwijderen op 30 september 2019 nog intact. Er heeft afsterven van Aziatische duizendknoop-wortels plaatsgevonden over het gehele proefvlak. Na verwijderen van het folie zijn geen levende restanten van Aziatische duizendknoop aangetroffen. Wel is aan de rand, net buiten het folie een plant aangetroffen. Mogelijk is dit een uitloper van een plant uit het proefvlak.

In proefvlak F heeft eveneens geen analyse van het zuurstofgehalte plaatsgevonden. De folie was binnen twee maanden op enkele plekken gescheurd. Bij de scheuren heerste hierdoor vrij snel geen anaerobe condities meer. Op de locaties waar de folie gescheurd was zijn levende wortels en plantjes Aziatische duizendknopen vastgesteld (Figuur 11).



Figuur 11. In proefvlak F is op de locatie waar binnen twee maanden de folie gescheurd is de Aziatische duizendknoop weer opgekomen.

3.1.3 Ontwikkeling HEEM-mengsel

In proefvlak A is de HEEM-vegetatie goed opgekomen. Naast soorten uit het zadenmengsel zijn ook andere kruidachtigen opgekomen, zoals herderstasje. Dit duidt erop dat de behandeling de kiemkracht van soorten uit de zaadbank niet aantast.

De vegetatie die in proefvlak D is opgekomen is veel eenvoudiger dan in proefvlak A en F. Reukloze kamille is de dominante soort in dit proefvlak. De grond lijkt rijker en vochtiger.

In proefvlak F is een divers mengsel opgekomen. De grond lijkt schraler dan in andere proefvlakken, wat kan verklaren dat er meer soorten uit het mengsel zijn opgekomen.

Doordat in alle proefvlakken soorten uit het HEEM-mengsel zijn opgekomen lijkt het erop dat de behandeling van de proefvlakken geen invloed hebben op het kiemen van de zaden uit het mengsel (Figuur 12). De verschillen tussen de proefvlakken zijn eerder terug te voeren op verschillen in de omstandigheden, zoals vochtigheid en voedselrijkdom, tussen de proefvlakken.



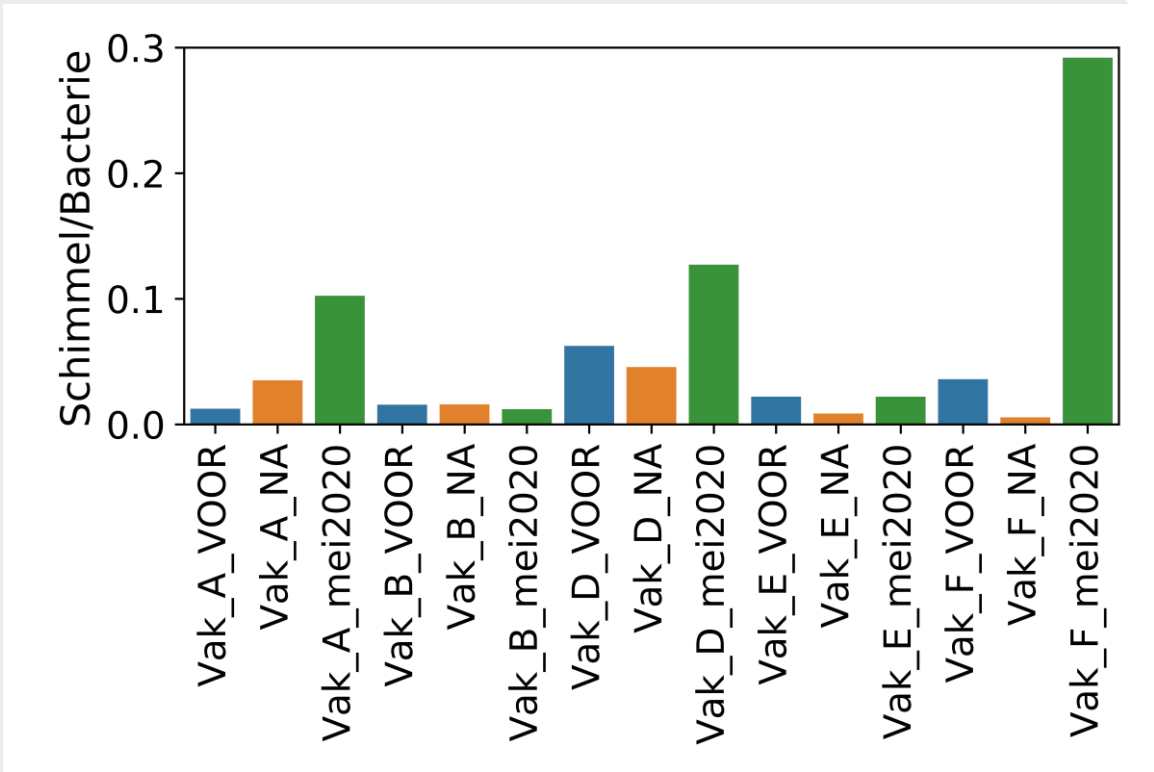
Figuur 12. De HEEM-vegetatie is op 30 september 2019 gezaaid en blijkt op 6 mei 2020 goed opgekomen.

3.2 DNA-analyse

Er zijn weinig verschillen aangetoond tussen de voor- en nabehandeling van de proefvlakken. In de ordinarie komen de voor en nabehandeling in het zelfde cluster naar voren. De kleine verschillen tussen de voor- en nabehandeling zijn eerder toe te wijzen aan seizoensinvloeden. Het ligt niet voor de hand dat de verschillen te verklaren zijn door de toegepaste behandeling.

De verschillen tussen de proefvlakken is terug te voeren op de samenstelling van de grond. Deze is niet homogeen over het terrein van de Keijenberg aanwezig.

Bij de analyse van de monsters die op 7 mei 2020 genomen zijn blijkt dat er een groot verschil tussen de referentie- en proefvlakken is in de schimmel-bacterie-ratio. In de proefvlakken is het aandeel schimmels ten opzichte van bacteriën veel groter dan op de referentievlakken waar Aziatische duizendknoop nog staat (Figuur 13). Het is waarschijnlijk dat dit komt door de andere soortensamenstelling op de locaties.



Figuur 13. De schimmel-bacertie-ratio van de proefvlakken (A, D en F) en de referentievlakken (B en E). De monsters zijn genomen op 6 mei 2019, 30 september 2019 en 7 mei 2020.

4. Aanbevelingen voor vervolgprouven

Naar aanleiding van de uitgevoerde proef zijn er enkele aanbevelingen te formuleren:

1. Folie over een grotere oppervlakte aanbrengen om te voorkomen dat Aziatische duizendknoop onder de randen doorgroeit (4 meter buiten de groeiplaats);
2. Dikkere luchtdichte folie toepassen en afdekken met een niet-doorzichtige folie ter voorkom dat vogels het folie beschadigen op zoek naar voedsel;
3. Een laag van 2 cm grond op het folie als verzwaren van de afdekfolie om scheuren te voorkomen.

5. Team

Dit onderzoek is een samenwerking tussen verschillende partijen. In onderstaande tabel zijn de deelnemers en hun rol in het project opgesomd.

Naam	Organisatie	Rol
Bart-Jan Heideveld	RANOX vestiging Wekerom	Coördinatie uitvoering
Egbert Sportel	Provincie Gelderland	Beschikbaar stellen locatie
Gert-Jan Koopman	Heem	Leverancier zaden
Henk Meints	Thatchtec	Leveranciers herbiekorrel en folie, begeleiding bij uitvoering
Johannes Regelink	RANOX landelijk	Projectleider, inhoudelijke begeleiding, nemen bodemmonsters
Joyce Penninkhof	ProBos	Externe waarnemer uitvoeren en resultaten proef
Robbert van Himbeek	Datura	Analyse bodemmonsters
Peter van den Brink	Van de Haar Groep	Uitvoering werkzaamheden
Arthur Hoffmann	RANOX vestiging Wageningen	Rapportage schrijven