

Bodemprotisten en hun rol bij het onderdrukken van ziekteverwekkers

Nathalie Amacker¹ & Zhilei Gao^{1,2}

n.amacker@uu.nl;
z.gao@eurostyle.nl

¹ Institute of Environmental Biology, Ecology & Biodiversity, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, the Netherlands

² ECOstyle B.V., Ecommunitypark 1, 8430 AC Oosterwolde, the Netherlands

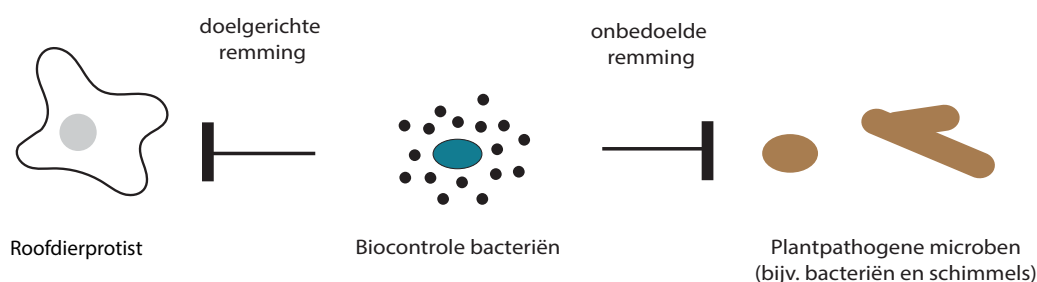
Protisten

Protisten zijn microbiële organismen, meestal eencellig, die samen met de planten, dieren en schimmels tot de eukaryoten behoren. Minder bekend is dat protisten wijdverbreid en overvloedig aanwezig zijn in de bodem (Singer et al., 2021; Xiong et al., 2021) met naar schatting 10^4 - 10^5 cellen per gram landbouwgrond (Ekelund en Rønn, 1994). Ze zijn ook heel divers met 12.000 geïdentificeerde bodemsoorten, wat overigens maar ongeveer 2% van de totale geschatte soortenrijkdom vertegenwoordigt (> 1.000.000 soorten; Geisen et al., 2018). Om in de bodem te gedijen, hebben de meeste terrestrische protisten ook het vermogen ontwikkeld om resistente, slapende structuren te bouwen die bekend staan als cysten, om ongunstige omstandigheden zoals uitdroging te overleven (Geisen et al., 2018). De grootte van protisten beslaat een grote range van minder dan 10 µm tot meer dan 1 mm (Geisen et al., 2017). Bovendien bestaat er binnen de protisten ook een reeks morfotypes, van flagellaten met een of twee flagellen (zweepbaren) om te zwemmen en op hun prooi te jagen in waterfilms, tot naakte amoeben met flexibele lichamen om op oppervlakken te kruipen en met lang reikende pseudopodia (schijnvoetjes) waardoor ze kleine holtes kunnen bereiken op zoek naar prooi (Geisen et al., 2018). Dankzij de morfologische en fylogenetische diversiteit van protisten kunnen zij een breed scala aan functionele rollen in de bodem vervullen, namelijk als fototrofe algen, als planten dierparasieten en als ‘microbioom-roofdieren’. De meest bekende en meest voorkomende functie van protisten in de bodem is die van roofdieren, in de oude literatuur “protozoa” genoemd, die gekenmerkt worden door het verzwelgen van hun prooi (Singer et al., 2021; Xiong et al., 2021). Hoewel het meeste onderzoek zich gericht heeft op protisten als bacterivoren, waarbij meestal fagocytose wordt gebruikt om kleinere bacteriën op te nemen (Clarholm, 1985; de Ruiter et al., 1995), hebben veel onderzoeken het vermogen van protisten gerapporteerd om verschillende en zelfs grotere organismen aan te vallen en zich ermee te voeden (Geisen et al., 2018). Veel protisten kunnen zich bijvoorbeeld voeden met schimmelsporen, sommige hebben aangepaste structuren om schimmelhyfen te penetreren en andere vertonen nog complexere coöperatieve strategieën om zich te voeden met nematoden. Protisten zijn dus belangrijke spelers in het bodemvoedselweb vanwege hun predatie. Ze hebben een directe invloed op aantal en gemeenschapssamenstelling van hun prooi, en

kunnen uiteindelijk de functies van het bodemecosysteem veranderen, waaronder de onderdrukking van (planten)pathogenen en de nutriëntenkringloop (Gao et al., 2019). In dit artikel presenteren we de rol van roofdierprotisten in bodems, hun relatie tot plantenpathogenen en hun potentie als biologisch bestrijdingsmiddel.

Rol bij het onderdrukken van ziekteverwekkers

Als microbiële roofdieren zijn bodemprotisten in staat om ziekteverwekkers te onderdrukken door zich rechtstreeks met hen te voeden. Hoewel het duidelijk is dat roofdierprotisten zich kunnen voeden met bacteriën, schimmelsporen, gisten, protisten, en zelfs nematoden, is het onduidelijk hoeveel van de prooien ook (planten)pathogenen kunnen zijn. In 1942 testte Singh het vermogen van roofdierprotisten om zich te voeden met een reeks prooien, waaronder plantenpathogenen. Hij vond dat de meeste (planten)pathogene bacteriën een geschikte prooi voor de geteste protist waren. Meer recent onderzoek toonde dat vijf vrijlevende amoeben een remmende invloed hadden (*i.e.* doden of verminderen van de groei) op de rijst-infecterende bacterie *Xanthomonas oryzae* (Long et al., 2018). Drie amoeboiden protisten, geïsoleerd uit een natuurlijk onderdrukkende bodem, waren ook in staat zich te voeden met de “take-all”-schimmel (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (Chakraborty et al., 1983). Bovendien werd waargenomen dat deze protisten zich voedden met de gepigmenteerde schimmelcellen van *Cochliobolus sativus* (het geslachtsstadium van *Bipolaris sorokiniana*, de veroorzaker van vlekkenziekte en wortelrot bij tarwe en gerst); het pigment melanine zorgt gewoonlijk voor resistentie tegen microbiële lysis en het vermogen om zich met deze cellen te voeden plaatst deze mycofaag-protisten in een unieke positie (Chakraborty et al., 1983). Verscheidene roofdierprotisten, waaronder sommige grote amoeben van de Vampyrellidae en kleinere schaaldragende amoeben, zouden zich ook voeden met nematoden (Geisen et al., 2015; Rønn et al., 2012). In de jaren 80 en daarvoor werden veel van deze nematoden-etende protisten speciaal bestudeerd in laboratoria vanwege hun mogelijke rol als nematicide (Rønn et al., 2012). Ondanks studies over het onderwerp en rapporten over directe voeding met (planten)pathogenen, weten we niet of de voeding van protisten met (planten)pathogene bacteriën, schimmels en/



Figuur 1: De schadelijke activiteit van antimicrobiële verbindingen die gewoonlijk worden geproduceerd door zogenaamde biocontrole-bacteriën. Deze antimicrobiële verbindingen remmen plantenpathogenen en predatoren als protisten.

of nematoden al dan niet bijdraagt tot de natuurlijke onderdrukingskracht van de bodem.

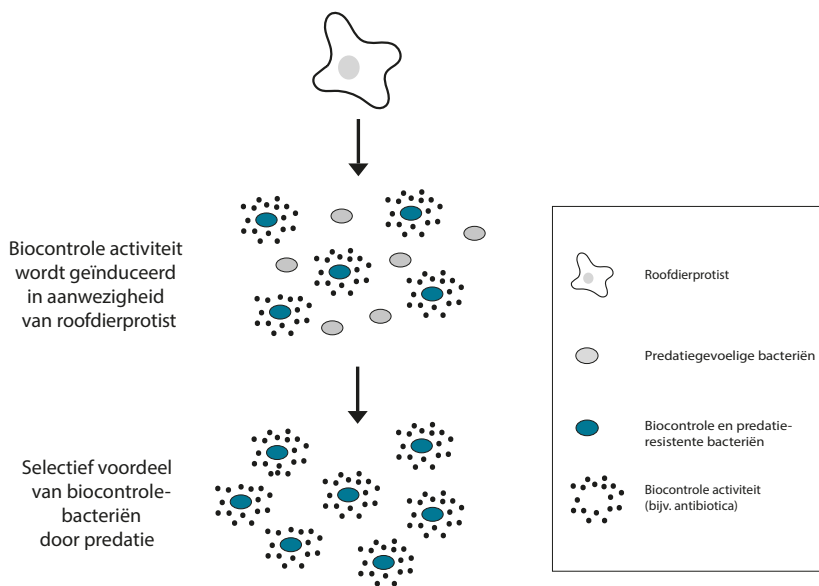
Naast de mogelijk directe rol van roofdierprotisten om pathogenen te onderdrukken, kunnen ze ook fungeren als stimulators van natuurlijke gewasbeschermende stoffen in de bodem. Microbiële prooien hebben verschillende verdedigingsmechanismen ontwikkeld tegen predatie door protisten (Matz and Kjelleberg, 2005). Bacteriën kunnen bijvoorbeeld antibiotica en exoproteases uitscheiden om predatie te voorkomen. Er is zelfs aangetoond dat de aanwezigheid en de roofzuchtige activiteit van protisten de productie van 2,4-diacetylphloroglucinol (gewoonlijk afgekort als DAPG) stimuleert (Jousset and Bonkowski, 2010) evenals de biosynthese van lipopeptide (Song et al., 2015). Van beide verbindingen is ook bekend dat ze plantenpathogenen remmen. Deze antibiotische verbindingen, die door bacteriën worden geproduceerd in aanwezigheid van predatie, zijn sterk gecorreleerd met gewasbeschermende eigenschappen van bacteriën (figuur 1). De waargenomen correlatie tussen predatieweerstand en gewasbeschermende eigenschappen (Amacker et al., 2020) suggereert dat predatie door protisten het ontstaan en het behoud van biocontrole-activiteit door bacteriën in gang zet (Jousset, 2012; Müller et al., 2013). De stimulering van bacteriële gewasbeschermende eigenschappen door predatie kan aldus bijdragen tot ziekte-onderdrukking in de bodem (Bahroun et al., 2021) en de overleving en activiteit van nuttige bacteriën in de bodem verhogen (Weidner et al., 2017).

'Biocontrole-bacteriën' genieten bovendien een selectief voordeel in aanwezigheid van de predatoren (figuur 2): bodemprotisten voeden zich bij voorkeur met niet-toxische bacteriën, waardoor de concurrentie wordt verminderd en de overleving van

biocontrole-bacteriën wordt bevorderd (Jousset et al., 2006, 2009). Deze verhoogde overleving van biocontrole-bacteriën in aanwezigheid van roofdierprotisten werd voor het eerst aangetoond in een laboratorium-omgeving, maar er komen ook nieuwe bewijzen uit veldexperimenten (Agaras et al., 2020). Agaras en collega's ontdekten dat de toename van de opbrengst in verband met de inoculatie van plantengroeibevorderende bacteriën het best werd voorspeld, niet door hun plantengroeibevorderende eigenschappen *in situ*, maar door hun biocontrole-eigenschappen, wat waarschijnlijk verband houdt met een concurrentievoordeel in de rhizosfeer, onder meer bij het ontlopen van predatie. Er is ook gesuggereerd dat de door protisten veroorzaakte overproductie van antimicrobiële verbindingen het immuunsysteem van de plant zou kunnen stimuleren. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat de overproductie van DAPG door *Pseudomonas protegens* CHA0 de immunerespons van *Arabidopsis thaliana* induceert (Iavicoli et al., 2003).

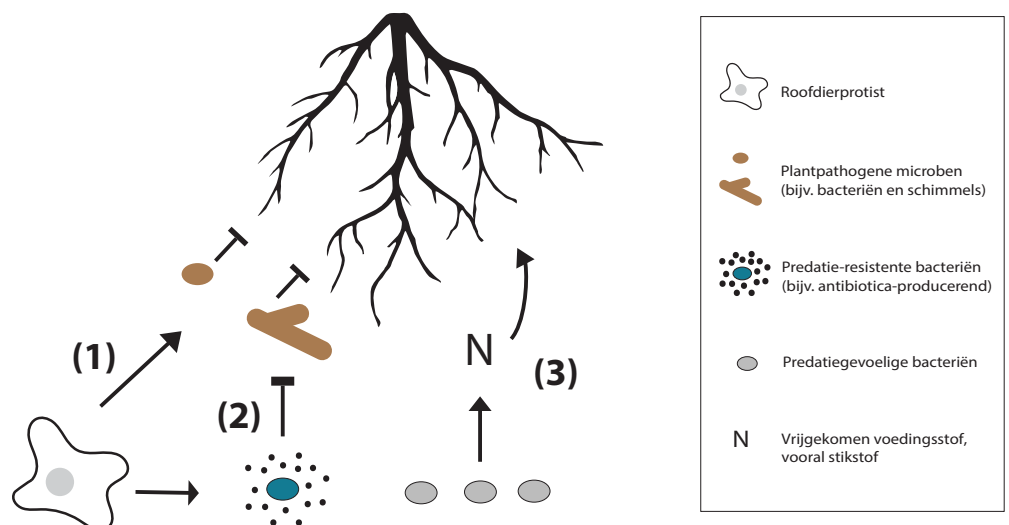
De microbiële lus als bijkomend voordeel

Roofdierprotisten spelen ook een essentiële rol in de zogenaamde microbiële lus, een proces dat doorgaans leidt tot het vrijkomen van voedingsstoffen, met name stikstof, uit de microbiële biomassa, wat uiteindelijk de plantengroei ten goede komt (Clarholm, 1985). Planten wijzen 10-40% van hun fotosynthetische koolstof toe aan hun wortels, waar veel bacteriën kunnen groeien (Singh et al., 2004), en waarbij stikstof, dat als eiwit vastgelegd was in de biomassa van de bacteriën, wordt gemobiliseerd. Omdat de C:N-verhouding van prooibacteriën meestal vergelijkbaar is met of lager dan die van protisten, moet de overtollige stikstof worden uitgescheiden



Figuur 2: De selectieve druk van predatorprotisten op een bacteriële gemeenschap. Roofdierprotisten veroorzaken verdedigingsmechanismen, waaronder het vrijkomen van antimicrobiële - (biocontrole)-verbindingen, wat leidt tot een selectief voordeel voor de biocontrole-bacteriën.

door de roofdierprotisten. Ongeveer een derde van de verbruikte stikstof komt vrij en is beschikbaar voor andere micro-organismen en planten. Een toename tot 50% van het drooggewicht en stikstofgehalte werd waargenomen bij planten die gekweekt waren in bodems die zowel bacteriën als protisten bevatten, vergeleken met bodems zonder protisten (Clarholm, 1985).



Figuur 3: Het mogelijk gunstige effect van protistenpredatie op planten. Links: (1) directe voeding op pathogenen, en (2) het versterkende effect op gewasbeschermende activiteit en overleving van biocontrole-bacteriën; Rechts: (3) de afgifte van voedingsstoffen uit de bacteriële pool, waardoor vooral stikstof beschikbaar komt voor planten met als gevolg ondersteuning van de plantengroei.

Conclusie

Het belang van roofdierprotisten bij het beschermen van planten is nog grotendeels onbekend. Hoewel roofdierprotisten zich kunnen voeden met verschillende plantenpathogenen, is het met name de roofdruk die uiteindelijk bijdraagt aan de bescherming van planten. De roofdruk leidt namelijk tot afweermechanismen in bacteriën, waaronder de productie van antibiotica, wat zorgt voor remming van de roofdieren én de plantenpathogenen, en op die manier resulteert in de bescherming van planten. De aanwezigheid en activiteit van roofdierprotisten zal dus waarschijnlijk bacteriën met biocontrole-eigenschappen ondersteunen, en uiteindelijk de gezondheid van planten ondersteunen. Vanwege hun roofzuchtige activiteit ondersteunen protisten de plantengroei verder via de microbiële lus. Bodemprotisten worden langzaam maar zeker steeds meer erkend vanwege hun essentiële ecologische rol in de bodem, waaronder de onderdrukking van plantenpathogenen (figuur 3). Rekening houden met de rol en toepassing van protisten bij onderzoek naar bodemgezondheid zou een hogere efficiëntie van biologische bestrijdingsmiddelen mogelijk kunnen maken en de gereedschapskist kunnen uitbreiden om planten tegen ziekteverwekkers te beschermen.

Dankwoord

We danken Prof. George Kowalchuk (Utrecht Universiteit), Dr. Stefan Geisen (Wageningen Universiteit) en Pier Oosterkamp (ECOSTyle B.V.) voor het advies en commentaar op dit artikel. Speciale dank aan Doriet Willemsen (KNPV) voor het proeflezen van de tekst.

Referenties

- Agaras, B.C., Noguera, F., González Anta, G., Wall, L., Valverde, C., 2020. Biocontrol potential index of pseudomonads, instead of their direct-growth promotion traits, is a predictor of seed inoculation effect on crop productivity under field conditions. *Biological Control*. 143, 104209.
- Amacker, N., Gao, Z., Agaras, B.C., Latz, E., Kowalchuk, G.A., Valverde, C.F., Jousset, A., Weidner, S., 2020. Biocontrol Traits Correlate With Resistance to Predation by Protists in Soil Pseudomonads. *Frontiers in microbiology*. 11, 3164.
- Bahroun, A., Jousset, A., Mrabet, M., Mhamdi, R., Mhadhbi, H., 2021. Protists modulate Fusarium root rot suppression by beneficial bacteria. *Applied Soil Ecology*. 168, 104158.
- Chakraborty, S., Old, K.M., Warcup, J.H., 1983. Amoebae from a take-all suppressive soil which feed on *Gaeumannomyces graminis tritici* and other soil fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 15, 17-24.
- Clarholm, M., 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. Biochem.* 17, 181-187. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90113-0)
- de Ruiter, P. C., A.-M. Neutel, and J. C. Moore. 1995. Energetics, Patterns of Interaction Strengths, and Stability in Real Ecosystems. *Science* 269 (5228): 1257-60. <https://doi.org/10.1126/science.269.5228.1257>.
- Ekelund, F., Rønn, R. 1994. Notes on Protozoa in Agricultural Soil with Emphasis on Heterotrophic Flagellates and Naked Amoebae and Their Ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 15 (4): 321-53. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00144.x>.
- Gao, Z., Karlsson, I., Geisen, S., Kowalchuk, G., Jousset, A., 2019. Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome. *Trends in Plant Science*. 24, 165-176.
- Geisen, S., Rosengarten, J., Koller, R., Mulder, C., Urich, T., Bonkowski, M., 2015. Pack hunting by a common soil amoeba on nematodes. *Environmental microbiology*. 17, 4538-4546.
- Geisen, S., Mitchell, E. A.D., Wilkinson, D. M., Adl, S., Bonkowski, M., Brown, M. W., Fiore-Donno, A. M., et al. 2017. Soil Protistology Rebooted: 30 Fundamental Questions to Start With. *Soil Biology and Biochemistry* 111 (August): 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.001>.
- Geisen, S., Mitchell, E. A D, Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F., Fernández, L. D et al. 2018. Soil Protists: A Fertile Frontier in Soil Biology Research. *FEMS Microbiology Reviews* 42 (3): 293-323. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy006>.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J.-P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular plant-microbe interactions*. 16, 851-858.
- Jousset, A., Lara, E., Wall, L.G., Valverde, C., 2006. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 7083-7090.
- Jousset, A., Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *The ISME journal*. 3, 666-674.
- Jousset, A., Bonkowski, M., 2010. The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biology and Biochemistry*. 42, 1647-1649.
- Jousset, A., 2012. Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environmental microbiology*. 14, 1830-1843.
- Long, J.J., Jahn, C.E., Sánchez-Hidalgo, A., Wheat, W., Jackson, M., Gonzalez-Juarrero, M., Leach, J.E., 2018. Interactions of free-living amoebae with rice bacterial pathogens *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola*. *PLoS One* 13, e0202941.
- Matz, C., Kjelleberg, S., 2005. Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in microbiology*. 13, 302-307.
- Müller, M.S., Scheu, S., Jousset, A., 2013. Protozoa Drive the Dynamics of Culturable Biocontrol Bacterial Communities. *PLoS One* 8, e66200.
- Rønn, R., Vestergård, M., Ekelund, F., 2012. Interactions between bacteria, protozoa and nematodes in soil. *Acta Protozoologica*. 51, 223-235.
- Singer, D., Seppely, C. V.W., Lentendu, G., Dunthorn, M., Bass, D., Belbahri, L., Blandenier, Q. et al. 2021. Protist Taxonomic and Functional Diversity in Soil, Freshwater and Marine Ecosystems. *Environment International* 146 (January): 106262. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106262>.
- Singh, B.N., 1942. Selection of bacterial food by soil flagellates and amoebae. *Annals of Applied Biology*. 29, 18-22.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., Murrell, J. C. 2004. Unravelling Rhizosphere-Microbial Interactions: Opportunities and Limitations. *Trends in Microbiology* 12 (8): 386-93. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.008>.
- Song, C., Mazzola, M., Cheng, X., Oetjen, J., Alexandrov, T., Dorrestein, P., Watrous, J., van der Voort, M., Raaijmakers, J.M., 2015. Molecular and chemical dialogues in bacteria-protista interactions. *Scientific reports*. 5, 12837 (2015).
- Weidner, S., Latz, E., Agaras, B., Valverde, C., Jousset, A., 2017. Protozoa stimulate the plant beneficial activity of rhizospheric pseudomonads. *Plant Soil* 410, 509-515. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3094-8>
- Xiong, W., Jousset, A., Li, R., Delgado-Baquerizo, M., Bahram, M., Logares, R., Wilden, B., de Groot, G.A., Amacker, N., Kowalchuk, G.A., Shen, Q., Geisen, S., 2021. A global overview of the trophic structure within microbiomes across ecosystems. *Environ. Int.* 151, 106438. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2021.106438>