

Rapport

Proefproject e-BioSoilCITY

eDNA biodiversiteit in Nederlandse stedelijke bodems

In opdracht van
City Deal Openbare Ruimte (CDOR), Ontwikkelteam 1



Sjoerd Gremmen, Jorinde Nuytinck en Michael Stech
Onderzoek & Onderwijs, Naturalis Biodiversity Center
Leiden, 22-12-2023



Samenvatting

Dit onderzoek geeft voor het eerst op grotere schaal inzicht in de microbiële biodiversiteit van bodems in straten van Nederlandse steden. In vijf steden (Amsterdam, Leiden, Den Haag, Dordrecht en Tilburg) zijn in totaal 31 sets van straten met lindes (*Tilia* sp.) en naburige straten zonder bomen met elkaar vergeleken. Van 465 bodemmonsters is de diversiteit van DNA sequenties van schimmels (fungi) en prokaryoten (bacteriën en Archaea) bepaald door middel van (environmental) DNA metabarcoding, om de invloed van de diepere ondergrond, de aanwezigheid van straatbomen en verschillen tussen drie typologieën (boomspiegel, stoep met tegels, rijweg met klinkers) te onderzoeken.

De moleculaire analyse leverde een enorme diversiteit op van 33.718 verschillende sequenties van schimmels en 116.215 sequenties van prokaryoten. De eerste analyses die voor dit rapport zijn uitgevoerd laten al zien dat de microbiële biodiversiteit niet toevallig verdeeld is maar dat er patronen te zien zijn die veroorzaakt worden door bekende, maar deels ook door (nog) onbekende of niet gemeten factoren (zoals variatie in de herkomst, geschiedenis en chemische samenstelling van de bodem). De resultaten laten onder andere zien dat de diepere ondergrond weinig tot geen invloed heeft op de microbiële biodiversiteit van de toplaag van de bodem en dat monsters van dezelfde typologie meer op elkaar lijken dan monsters binnen dezelfde stad, vooral wat de boomspiegel betreft. Voor de diversiteit van schimmels is de aan- of afwezigheid van straatbomen een belangrijke factor. De ratio schimmels:bacteriën is groter in straten waar bomen staan, ook onder de stoep en de weg. Voor de diversiteit van prokaryoten (bacteriën en Archaea) lijken andere factoren een grotere rol te spelen, zoals open grond versus bestrating en verschillende grondsoorten onder de stoep en rijweg. De aanwezigheid van straatbomen (en waarschijnlijk ook andere vegetatie in de boomspiegels) leidt tot een grotere diversiteit en waarschijnlijk meer ecologische functies, waardoor de bodem weerbaarder tegen omgevingsstress zou kunnen worden. De grootte van de boomspiegel en verschillende mate van compactering binnen dezelfde typologie (parkeerstrook versus rijbaan) lijkt geen duidelijk effect te hebben op de microbiële diversiteit. De meeste schimmels breken organisch materiaal af; het advies om organisch materiaal te laten liggen is dus ook voordelig voor de schimmeldiversiteit. Een aantal groepen micro-organismen kunnen mogelijk worden gebruikt als bioindicatoren van bepaalde condities van stedelijke bodems, zoals Archaea die vooral onder de bestrating voorkomen.

Verder onderzoek op basis van de in dit project gegenereerde en nieuwe data zal een nog completer beeld van de microbiële bodembiodiversiteit in Nederlandse steden en hun functies in stedelijke ecosystemen geven. Op basis van de nieuwe inzichten kunnen indices worden ontwikkeld om specifieke kenmerken van bodemgezondheid te meten en toe te passen op specifieke gebruiksdoelen.

Inleiding

Opgave

Ontwikkelteam 1, onderdeel C van de City Deal Openbare Ruimte (CDOR) heeft als algemeen doel vastgesteld om *“nieuw beleid of handelingsperspectief te creëren t.b.v. een gezonde bodem en leefomgeving. Aan de basis van dit handelingsperspectief staat de ontwikkeling van een systeem van meetbare bodemkenmerken om te beoordelen of bepaalde bodems geschikt zijn voor het beoogde gebruiksdoel. Daarnaast is er behoefte het systeem te kunnen gebruiken om advies voor maatregelen te geven, specifiek voor het gewenste gebruik, op basis van de gemeten bodemkenmerken. Dit moet leiden tot een index voor bodem- en ondergrondgezondheid per bodemgebruiksdoel.”*

Het proefproject *e-BioSoilCITY* draagt bij aan de eerste stap van de ontwikkeling van een *index voor bodem- en ondergrondgezondheid*, door de basis te leggen om de microbiële biodiversiteit in stedelijke bodems te meten en te interpreteren. Het gaat hierbij om verborgen maar belangrijke organismen, met name schimmels (Fungi) en prokaryoten (bacteriën en Archaea), die alleen op basis van moleculaire analyse - (environmental) DNA metabarcoding - tot op soorten kunnen worden gemeten. We identificeren de soorten die in bodemonsters aanwezig zijn zo goed mogelijk - gebruik makende van de huidige wetenschappelijke kennis -, door de gedetecteerde DNA sequenties te vergelijken met een referentiebibliotheek van DNA barcodes van soorten en bepalen de samenstelling van de microbiële gemeenschappen. Naast het bepalen van de verschillen in soortdiversiteit en algemene patronen van deze diversiteit kunnen we een eerste inschatting maken van de functionele diversiteit en de ecologische rol die deze schimmels en prokaryoten spelen in de bodem.

DNA metabarcoding is slechts een van de meetmethoden om aan de hand van micro-organismen inzicht te krijgen in bodemgezondheid, maar wel een die tot nu toe onvoldoende wordt toegepast (Fierer et al. 2021). Daarbij is het belangrijk om aan te merken dat er geen ‘optimale’ gemeenschap van micro-organismen in de bodem bestaat, en dat deze organismen op zichzelf niet goed of slecht zijn. Het hangt van de context af of micro-organismen de bodem positief of negatief beïnvloeden. Uitgaande van de kennis van de totale microbiële diversiteit moeten indices worden ontwikkeld om specifieke kenmerken van bodemgezondheid te meten en toe te passen op specifieke gebruiksdoelen. De focus zou daarbij moeten liggen op het identificeren van microbiële bio-indicatoren voor kenmerken die met andere methoden moeilijker of minder goedkoop te meten zijn, zoals het meten van de beschikbaarheid en omzet van anorganische stoffen, het identificeren van ‘hotspots’ van biogeochemische processen, en het meten van concentraties van vervuilende stoffen (Fierer et al. 2021).

Achtergrond van dit onderzoek

In 2020 heeft Naturalis Biodiversity Center in opdracht van gemeente Amsterdam een eerste proef uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in de diversiteit van schimmels rondom stadsbomen. Bodemonsters genomen rond koppels van gezonde en zieke laanbomen (esdoorn en linde, met verschillende types mycorrhizaschimmels) werden geanalyseerd d.m.v. DNA metabarcoding. De resultaten lieten zien dat de schimmelgemeenschappen in de bodem niet willekeurig zijn samengesteld, maar dat er verschillen zijn tussen beide boomgenera en eveneens tussen gezonde en zieke bomen. Deze eerste proef bevestigt dat de eDNA methode gebruikt kan worden om de bodembiodiversiteit in verstedelijkt gebied in kaart te brengen, en dat er een relatie is tussen bodemorganismen en boomgezondheid.

Vervolgonderzoek naar patronen van bodembiodiversiteit in de stad is echter nodig, zoals:

1. bredere bemonstering, zowel qua aantallen bodemonsters als geografische spreiding in Nederland;
2. simultane moleculaire analyse van verschillende componenten van de bodembiodiversiteit (fungi, prokaryoten, bodemdieren);
3. correlatie met bovengrondse topologie (zoals mate van verzegeling en compactering van de bodem);
4. koppeling met bodemfactoren (bodemsoort, pH, saliniteit, nutriënten, textuur) en klimaatfactoren.

Doel en onderzoeksopzet e-BioSoilCITY

In dit project wordt een deel van de bovengenoemde aspecten verder onderzocht:

1. er wordt een groter aantal bodemonsters geanalyseerd in vijf steden die deel uitmaken van de CDOR;
2. de verschillen en verhoudingen in de samenstelling van fungi en prokaryoten worden vastgesteld op basis van een voor elke groep specifieke moleculaire DNA marker (ITS voor schimmels en 16S voor prokaryoten);
3. met de gegevens worden mogelijke correlaties van de bodembiodiversiteit met verschillende stedelijke factoren getoetst:
 - A. Onderliggende grondsoort (zand, klei/veen) waarop de stad is aangelegd: Het is belangrijk om te weten in hoeverre de grondsoort van invloed is op de bodembiodiversiteit in de bovenste, vaak kunstmatig aangebrachte bodemlaag, en in hoeverre er rekening moet worden gehouden met de diepere ondergrond bij toekomstige metingen.
 - B. Straatbomen: Een groot deel van de bodembiodiversiteit zal verbonden zijn aan de bovengrondse vegetatie. Door straten met of zonder bomen met elkaar te vergelijken kan de invloed van straatbomen worden bepaald.
 - C. Verschillende gebruiksdoelen van de bodem: De vergelijking van monsters genomen in de boomspiegel en onder de bestrating (voetpad, rijweg) zal een eerste indicatie geven van de invloed van open grond en verschillende mate van bodemcompactering.

Materiaal en methoden

Bemonstering

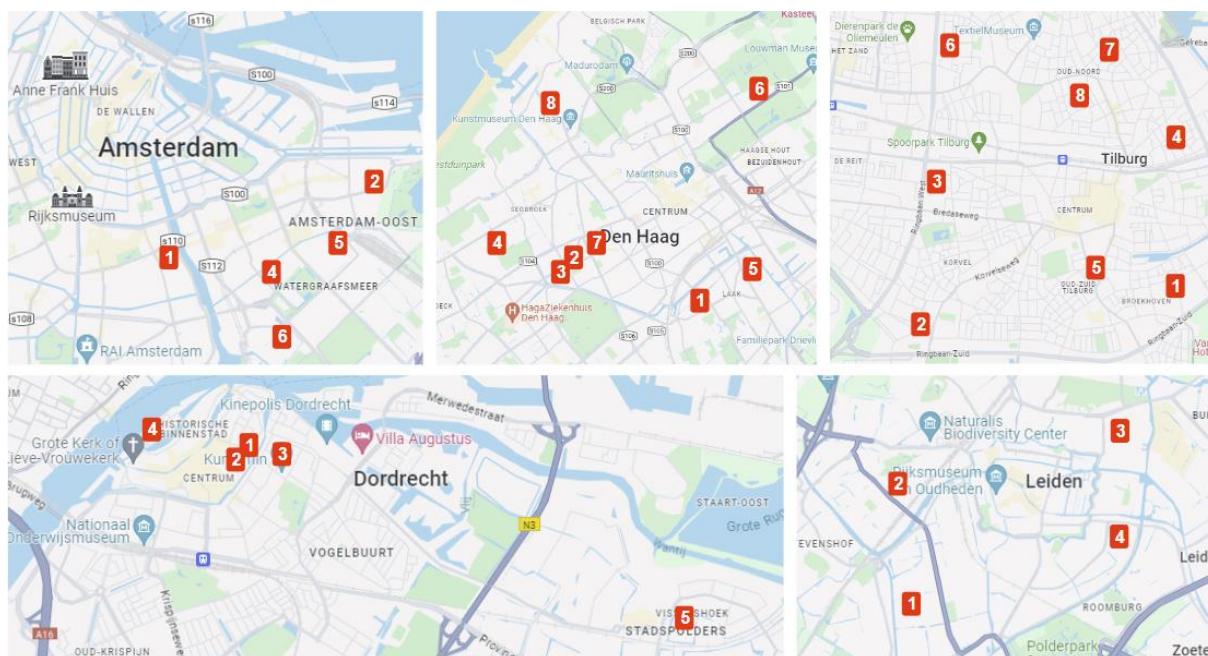
In vijf steden (Amsterdam, Leiden, Den Haag, Dordrecht en Tilburg) zijn straten met lindes (*Tilia* sp.) en naburige straten zonder bomen met elkaar vergeleken. De wortels van de linde gaan van nature een associatie aan met ectomycorrhiza schimmels - schimmelsoorten die behoren tot diverse groepen Ascomycota en Basidiomycota, twee van de hoofdgroepen (phyla) van de schimmels.

Per stad werden locaties met twee straten (A - met bomen, B - zonder bomen) gekozen die zo min mogelijk van elkaar verschilden qua bestrating, bebouwing, (aangeplant) groen en verkeersdichtheid. De bomen op alle locaties dienden ongeveer gelijk te zijn qua leeftijd en diameter (niet te jong of pas geplant). Het oorspronkelijke plan om in vier steden acht locaties (met telkens twee straten) per stad te bemonsteren is om verschillende redenen aangepast, waardoor uiteindelijk in vijf steden op vier tot acht locaties per stad monsters werden genomen, in totaal 465 bodemmonsters in 31 sets van straten (figuur 1).

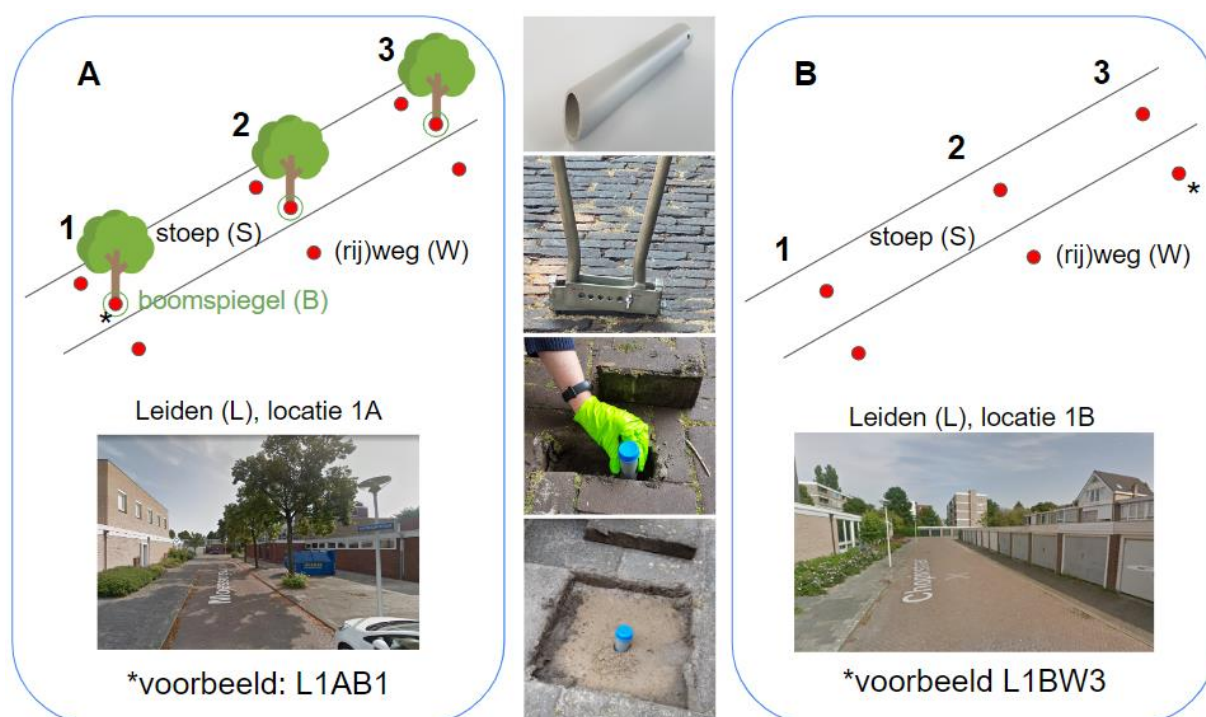
Per straat werden bodemmonsters genomen op drie locaties, en per locatie telkens een monster in drie typologieën (figuur 2): de open grond van de boomspiegel (straten met bomen, 0-1,5 m van de boom, onder het voetpad (meestal 30×30 cm tegels) en onder de rijweg (klinkers). Na het verwijderen van de tegels of klinkers met een klinkertrekker werden de monsters genomen door met een hamer een met deksel afgesloten pvc-buis (32 mm diameter, 15 cm lang) ca. 10 cm diep in de grond te slaan (figuur 2). De monsters bevatten dus grond van het bovenste deel van de (in natuurlijke bodems) meest biologisch actieve toplaag. Het buisje werd omhoog getrokken en de grond erin overgebracht naar een plastic zak. Vervolgens werd het gat gedicht en de klinkers of tegels weer teruggezet. De plastic zakken werden op Naturalis bewaard bij -20 °C tot aan de DNA extractie toe.

Wanneer het niet lukte om de klinkers van de rijweg te liften (vanwege hoge compactering) of de straat te smal was en de monsternamen het verkeer zou hebben belemmerd, werd uitgeweken naar de parkeerstrook met (op enkele uitzonderingen na) dezelfde type klinkers. Het bleek niet altijd mogelijk te zijn om een rechte lijn en gelijke afstanden tussen de individuele monsters per locatie aan te houden; afhankelijk van de stedelijke inrichting en waar het lukte om klinkers en tegels te liften, varieerde de afstand op de meeste locaties tussen de 1 en 4 meter (totale bandbreedte afstanden tussen 65 cm en 8,3 m).

Bij de monsternamen werd geprobeerd plantaardig materiaal en de grond tussen de voegen zo weinig mogelijk mee te nemen, maar bij de smalle klinkers van de rijweg was dit soms niet 100% mogelijk.



Figuur 1. Locaties van bemonstering in Amsterdam (1,2,4,5,6; voor de oorspronkelijk geplande locaties 3 in Amsterdam-West en 7/8 in Amsterdam-Noord werd geen vergunning verleend), Den Haag (1–8), Tilburg (1–8), Dordrecht (1–5) en Leiden (1–4).



Figuur 2. Bemonstering: schema's van de onderzoeksopzet (A - straten met bomen, B - straten zonder bomen), foto's van gereedschap en monsternamen (midden), en voorbeelden van straten en monstercodes. Straatfoto's: Google Streetview.

DNA sequentieanalyse

Elk bodemonster werd handmatig gehomogeniseerd. DNA werd geëxtraheerd uit een subsample van 0,25 g van elk monster. De DNA extractie (94 monsters tegelijk) werd uitgevoerd met de Qiagen MagAttract PowerSoil Pro DNA kit en Powerbead Pro platen (Qiagen) met behulp van een KingFisher™ Flex extractie robot (Thermo Fisher Scientific). DNA concentraties werden gemeten met een Lunatic absorbance spectrophotometer (Unchained Labs). Op elk DNA monster werd voor elke target DNA barcode een PCR amplificatie reactie met specifieke forward en reverse primers uitgevoerd. De barcode voor prokaryoten omvat een deel van het 16S gen (V4 regio) en voor fungi is de ITS2 marker als barcode gebruikt (Walters et al. 2015). De PCR producten werden in een aantal stappen (library preparation) voorbereid voor het sequensen. Alle monsters werden simultaan gesequenst door BaseClear B.V. (Leiden) op een Illumina Novaseq 5000 sequencer (250 bp paired-end sequencing), met als eindproduct twee zip files met de ruwe forward en reverse sequenties (reads) gesplitst per monster.

De reads werden in Naturalis bewerkt en geanalyseerd met de bioinformatische pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) in R (R Core Team 2022). De primer sequenties werden verwijderd en alle sequenties werden geknipt tot dezelfde lengte gebaseerd op de kwaliteit van de sequenties (16S: forward 210, reverse 160; ITS: forward 210, reverse 210). De samples die niet aan deze lengte voldeden, en sequenties met een kwaliteit van $Q < 30$ (0.1% fouten) na het knippen werden verwijderd. Vervolgens werd elk paar van bij elkaar horende reads (forward en reverse) samengevoegd en werden artefacten (chimeras) verwijderd. Dit leverde een lijst van unieke sequenties (ASV's - amplicon sequence variants), waarbij een ASV in meerdere monsters maar ook met meerdere reads binnen een monster kan voorkomen. Voor de taxonomische identificatie werd elke ASV vergeleken met sequenties in databases van 16S (SILVA; Quast et al. 2013, Yilmaz et al. 2014) en ITS (UNITE; Kõljalg et al. 2020, Abarenkov et al. 2023). De ASV's en hun taxonomische classificaties werden bij elkaar gebracht in een ASV tabel.

ASV's komen niet overeen met soorten, omdat ook binnen soorten genetische variatie aanwezig kan zijn en de verschillende sequenties binnen soorten als aparte ASV's worden meegeteld. Voorheen werden sequenties geclusterd tot OTUs (operational taxonomic units) om de hoeveelheid soorten te schatten. De OTU-methode heeft echter nadelen, zo is de grenswaarde om sequenties bij elkaar te voegen tot OTUs arbitrair. De analyses in dit rapport zijn gebaseerd op ASV's, wat tegenwoordig wordt aangeraden in de wetenschappelijke literatuur (bv. Callahan 2017). Wel zijn alle ASV's die minder dan 10 keer per monster voorkwamen niet meegenomen omdat de aanwezigheid in kleine aantallen minder betrouwbaar is. De grens van 10 reads per ASV per sample volgt Tedersoo et al. (2022) en is gebaseerd op een rarefaction analyse op de individuele samples uitgevoerd met de R-package vegan (Oksanen et al. 2017) die bepaalt of de diepte van sequensen voldoende was. Daarnaast is er een tweede rarefaction analyse uitgevoerd om per typologie te berekenen in hoeverre de data de totale diversiteit van de typologieën

beslaat. Hiervoor is de R-package iNext gebruikt (Chao et al. 2014).

Om naast de taxonomische diversiteit inzicht te krijgen in de functies van de aangetroffen schimmels en prokaryoten, kunnen functionele gegevens uit betreffende databases (FungalTraits, Pölme et al. 2020 voor schimmels; Faprotax, Louca et al. 2016 voor prokaryoten) worden toegevoegd aan de ASV tabel. Vooralsnog is dit met de huidige data alleen voor de schimmels gedaan, op basis van de primaire leefwijze (primary lifestyle; zie resultaten deel 3). Voor de bacteriën en Archaea worden mogelijke functies genoemd bij de discussie over de taxonomische diversiteit; een meer gedetailleerde analyse is vanwege het grote aantal mogelijke functies moeilijker en zal later worden uitgevoerd.

Data-analyse

Om de biodiversiteit per sample te meten is de ASV tabel omgezet naar een 1/0-matrix waarin de aan- of afwezigheid van elke ASV per monster is aangegeven. Per typologie is het aantal aanwezige ASV's bij elkaar opgeteld. Als een ASV aanwezig was in meerdere monsters van dezelfde typologie, werd deze dus gerekend als 1 (aanwezig in deze typologie). Uit de resulterende 1/0 tabel zijn schimmel:bacterie verhoudingen berekend en weergegeven in staafdiagrammen. Ook zijn vergelijkingen gemaakt tussen de verschillende typologieën door middel van venndiagrammen die het percentage unieke versus gedeelde ASV's weergeven (package ggvenn in R, Gao et al. 2021).

Naast de alfa-diversiteit (diversiteit binnen elk monster) is de Bray-Curtis dissimilariteit (bèta-diversiteit; diversiteit tussen monsters) berekend om de afzonderlijke samples met elkaar te vergelijken. Hiervoor is eveneens de R-package vegan gebruikt. Dit is een methode waarbij wordt gekeken naar de similariteit van ASV's tussen verschillende samples. De waarden uit deze berekening zijn multidimensionaal geschaald en in NMDS-grafieken geplott. Op basis van deze grafieken kan gekeken worden of samples uit dezelfde typologie ook meer op elkaar lijken dan op samples uit andere typologieën.

Resultaten en discussie

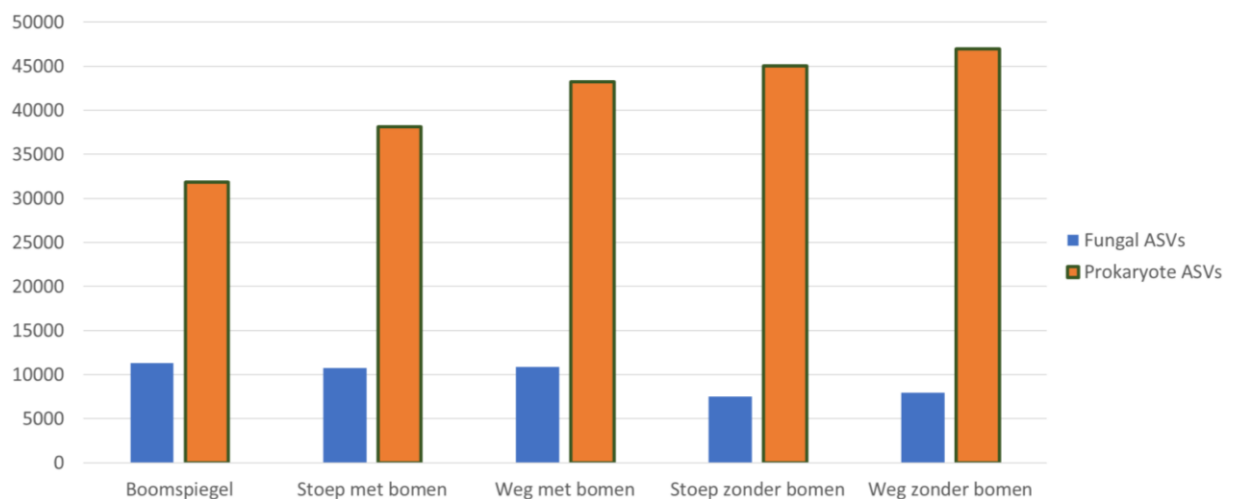
De moleculaire analyse leverde een enorme diversiteit van 33.718 verschillende ASV's van schimmels en 116.215 verschillende ASV's van prokaryoten op. Deze diversiteit wordt hieronder in drie delen geanalyseerd en bediscussieerd. Bijlage 1 geeft een overzicht van de aantallen ASV's per typologie en stad.

In het eerste deel worden de aantallen ASV's van schimmels, bacteriën en Archaea, en hun verhoudingen per typologie (boomspiegels, stoep en rijweg met en zonder bomen) geanalyseerd, waarbij alle monsters samen worden genomen. Het tweede deel richt zich op de mogelijke verschillen en verbanden tussen de bemonsterde steden en typologieën, en de mogelijke invloed van de diepere ondergrond op de microbiële diversiteit, op basis van de ASV-similariteit per monster. In het derde deel zoomen we in op de verschillen binnen de schimmels, bacteriën en Archaea, en onderzoeken we of er een verband is tussen de abundantie van bepaalde taxa of ecologische functies en de typologieën.

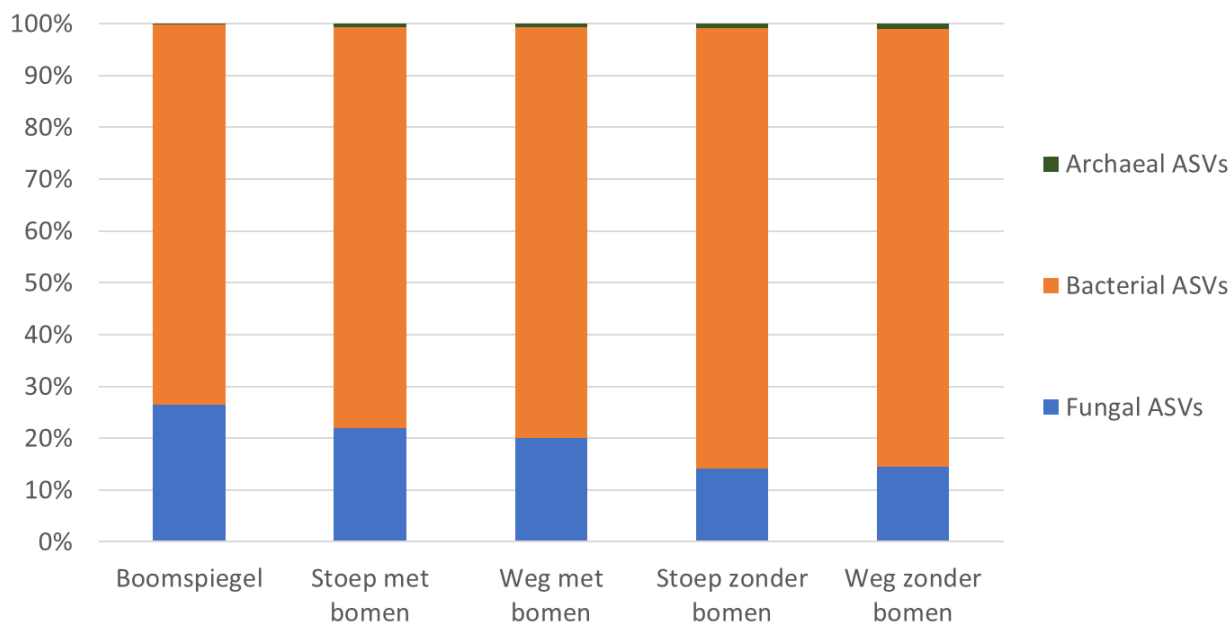
1. Totale diversiteit en verhoudingen per typologie

In alle monsters en in elke typologie (boomspiegel, stoep, rijweg) domineren de prokaryoten, met 31.880–46.943 ASV's tegenover 7.945–11.312 schimmel ASV's (figuur 3, bijlage 1). De procentuele verhouding is in figuur 4 getoond, waarbij ook duidelijk wordt dat binnen de prokaryoten de bacteriën verreweg dominant zijn; de Archaea maken slechts 0,17–1,06% uit.

Op locaties met bomen vinden we in verhouding meer schimmels, waarbij de boomspiegels het hoogste percentage schimmels tonen. De locaties zonder bomen zijn het meest bacterie-gedomineerd en ook het aantal Archaea is daar het hoogst, waarbij het verschil tussen stoep en rijweg gering is.

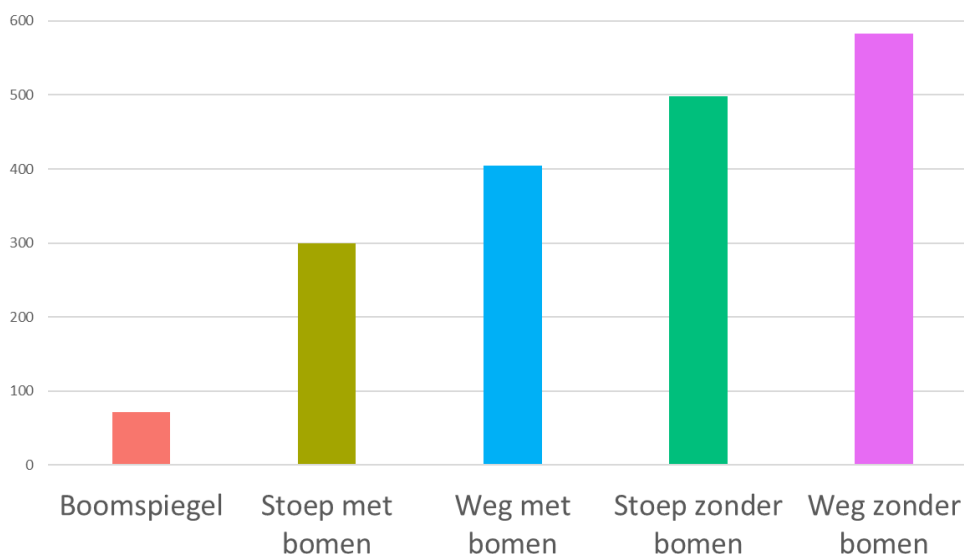


Figuur 3. Aantal ASV's behorend tot schimmels en prokaryoten, per typologie.



Figuur 4. Percentages ASV's behorend tot schimmels, bacteriën en Archaea, per typologie.

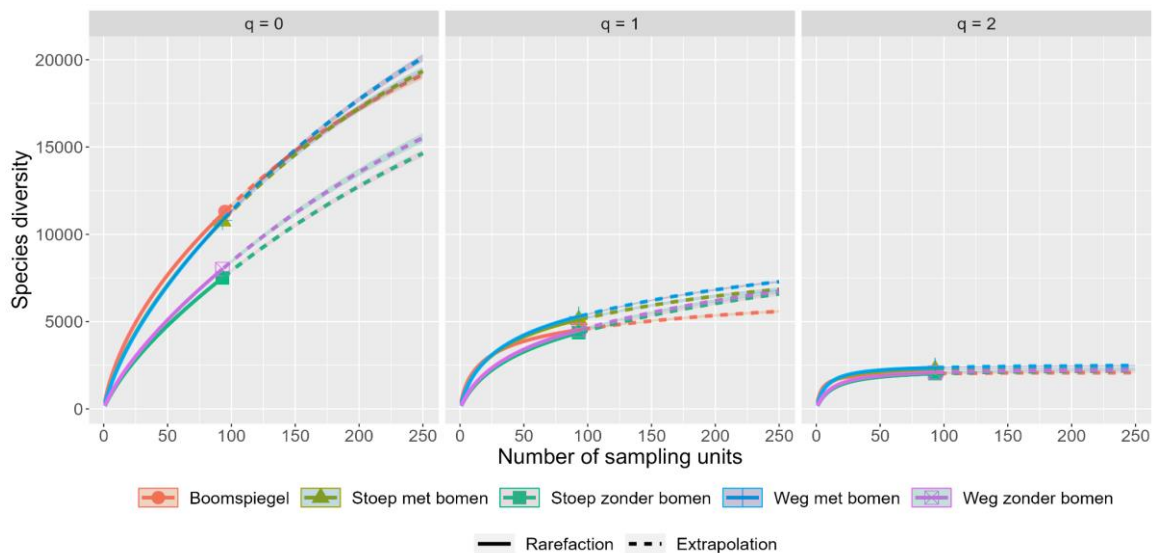
Archaea komen slechts met enkele honderden ASV's voor, maar het verschil tussen de typologieën is bij deze groep het grootst: Onder de rijweg zonder bomen komen meer dan 7 keer zoveel Archaea ASV's voor dan in de boomspiegel (figuur 5), terwijl deze verhouding bij schimmels en bacteriën ongeveer 1,5 is (figuur 3). Hoewel de meeste Archaea in gematigde habitats (vooral bodems) voorkomen, staan ze ook bekend om soorten die onder extreme omstandigheden (temperatuur, zuurgraad) kunnen leven. Aangezien de bodem onder bestrating een “extremer” habitat vormt en Archaea hier het meest gevonden zijn, kan deze groep mogelijk gebruikt worden als indicator voor “extreme” omstandigheden in stedelijke bodems.



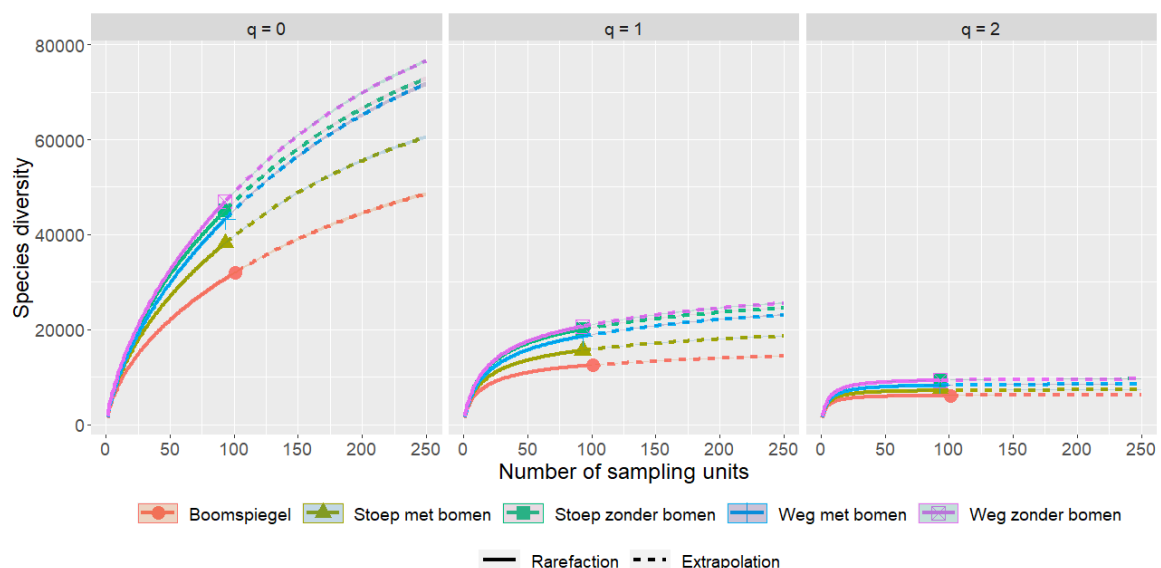
Figuur 5. Aantal ASV's van Archaea per typologie.

De rarefaction analyse (figuur 6) laat zien dat de waargenomen diversiteit nog niet de volledige diversiteit per typologie weerspiegelt ($q=0$), maar dat de meest abundante ASV's wel gevonden zijn ($q=1$ en $q=2$; kromme vlakt af en bereikt (bijna) een plateau). De daadwerkelijke diversiteit is dus voornamelijk hoger wat zeldzame ASV's betreft. Dat niet alle (zeldzame) ASV's zijn gevonden is begrijpelijk omdat we per locatie en typologie slechts één monster hebben genomen.

A



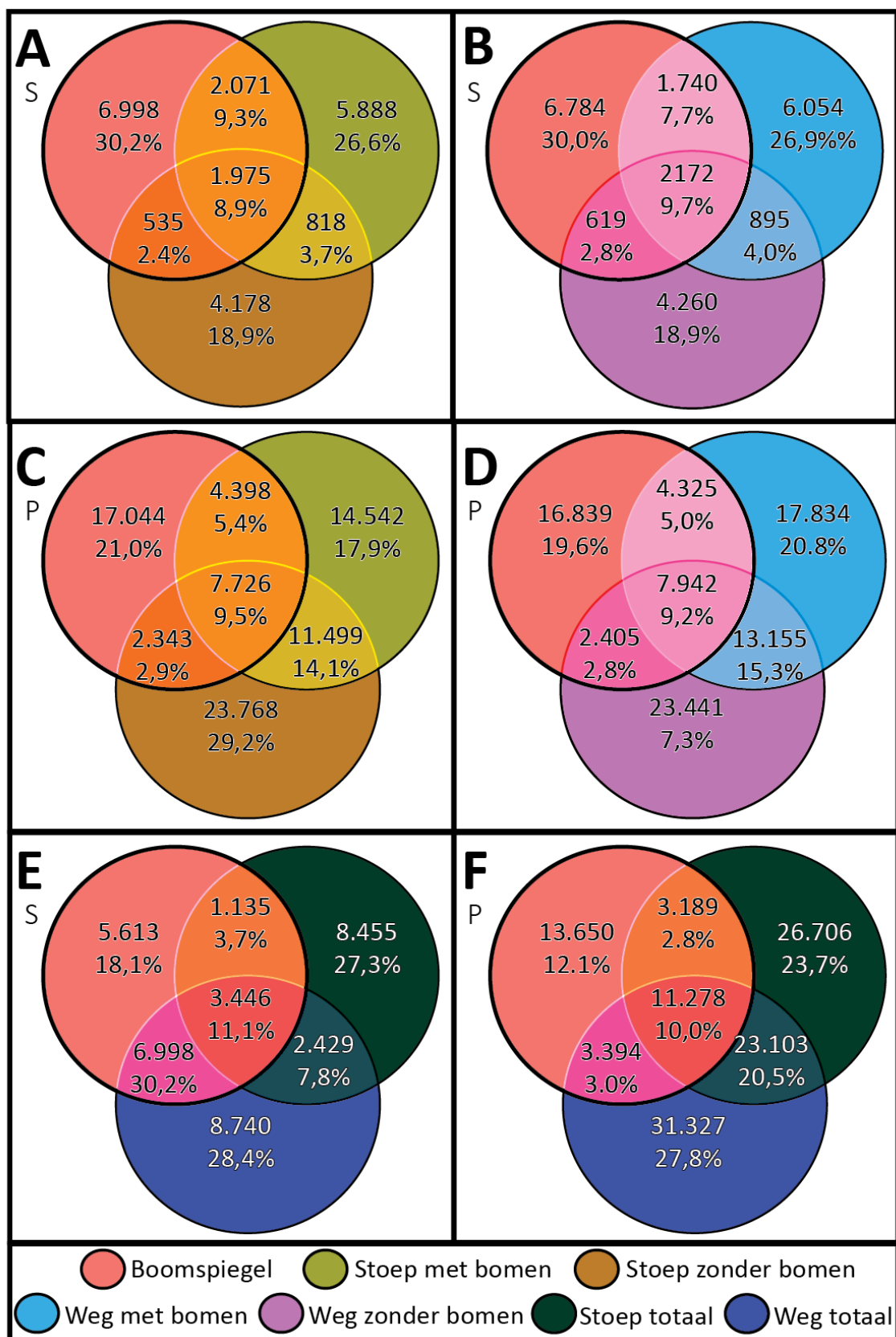
B



Figuur 6. Rarefaction analyse van de gedetecteerde diversiteit van schimmels (A) en prokaryoten (B). $q=0$: Totale diversiteit (zonder inachtneming van de abundantie van elke ASV). $q=1$: Shannon diversiteit (neemt mee hoe vaak een ASV in de verschillende monsters werd gevonden). $q=2$: Simpson diversiteit (vaak voorkomende ASV's wegen zwaarder mee dan zeldzame ASV's).

De venndiagrammen in figuur 7 laten zien hoeveel ASV's overeenkomen tussen typologieën of uniek zijn voor een bepaalde typologie. De meerderheid van alle ASV's is inderdaad uniek, dus komt alleen in de boomspiegel, onder de stoep of onder de rijweg voor. Dit is niet vreemd, aangezien we niet de volledige genetische diversiteit van elke topologie hebben kunnen bepalen (Figuur 6A/B). Wel zijn er duidelijke patronen te zien. De meeste unieke schimmels zijn in de boomspiegels te vinden en de meeste unieke prokaryoten onder de stoep, onafhankelijk van de aanwezigheid van bomen. Wat de schimmels betreft (figuur 7A/B) komt de boomspiegel meer overeen met de bedekte typologieën met bomen (stoep 18.2% overlap, rijweg 17.4%) dan met de stoep of rijweg zonder bomen (11.3 en 12.5%). Bij de prokaryoten (figuur 7C/D) is dit verschil ook aanwezig maar iets minder groot (14.9%/14.2% tegenover 12.4%/12.0%) en is er een grotere overlap in ASV's tussen de stoep met en zonder bomen en de rijweg met en zonder bomen (23.6% en 24.5%). Weg en stoep lijken meer op elkaar dan ze op de boomspiegel lijken, zowel voor schimmels (18.9% overlap; figuur 7E) als voor prokaryoten (30,5% overlap; figuur 7F). Verder is 12,1% van alle prokaryoten ASV's en 6.7% van alle schimmel ASV's algemeen voor alle stoepen en wegen samen (niet in figuur 7 getoond).

Deze resultaten suggereren dat voor schimmels de aan- of afwezigheid van bomen de belangrijkste bepalende factor is. Voor prokaryoten is dit de aanwezigheid van bestrating tegenover open grond in de boomspiegel. Experimenteel onderzoek in China heeft al geconcludeerd dat de samenstelling van bacteriën in de toplaag van de bodem verschilt tussen open grond, doorlatende en niet-doorlatende bestrating (Yu et al. 2019), en dat bestrating een groter effect heeft op de bacteriële diversiteit dan verschillende boomsoorten (Hu et al. (2021); zie verdere uitleg in deel 3. De monsters van het Chinese experiment zijn echter allemaal genomen in de buurt van bomen; vervolgonderzoek zou moeten aanwijzen wat het effect is van open grond zonder bomen. De verschillen tussen stoep en rijweg laten vermoeden dat ook de omstandigheden in deze twee 'habitats' verschillend zijn. Dit kan te maken hebben met het type bestrating (tegels versus klinkers), onderlaag (zand versus gruis) en minder of meer compactering (voetgangers versus auto's). Naarmate de omstandigheden extremer worden (boom/open grond → stoep → rijweg) lijken de bacteriën (en Archaea, zij het met een lage abundantie) toe te nemen.

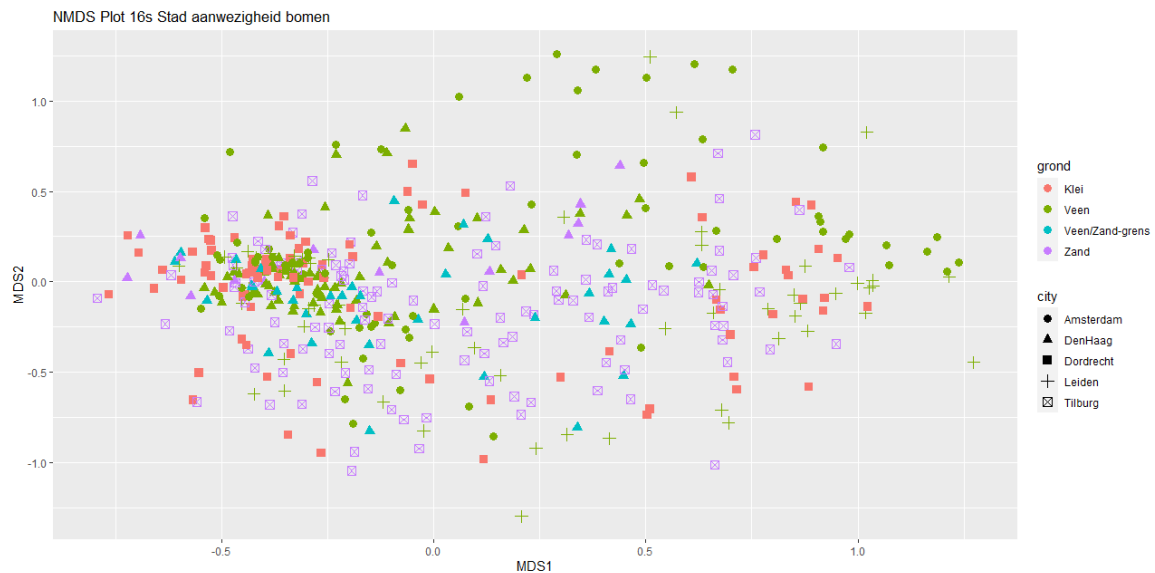


Figuur 7. Venndiagrammen die de aantallen en percentages van unieke en overlappende ASV's aangeven tussen boomspiegel en stoep met of zonder bomen (A, C), boomspiegel en weg met of zonder bomen (B, D), en boomspiegel, stoep en weg totaal (E, F). S = schimmels, P = prokaryoten.

2. Verbanden met de diepere ondergrond en bovengrondse typologieën

Figuur 8 laat de clustering zien van alle monsters volgens de diepere ondergrond (zand, klei of veen; bodemkaart van Nederland 1:50.000, atlasleefomgeving.nl) waarop het betreffende deel van de stad is gebouwd. Voor locaties in Den Haag die op de grens tussen zand en veen liggen is een aparte categorie toegevoegd omdat de ligging van de grens niet exact kon worden bepaald.

A



B

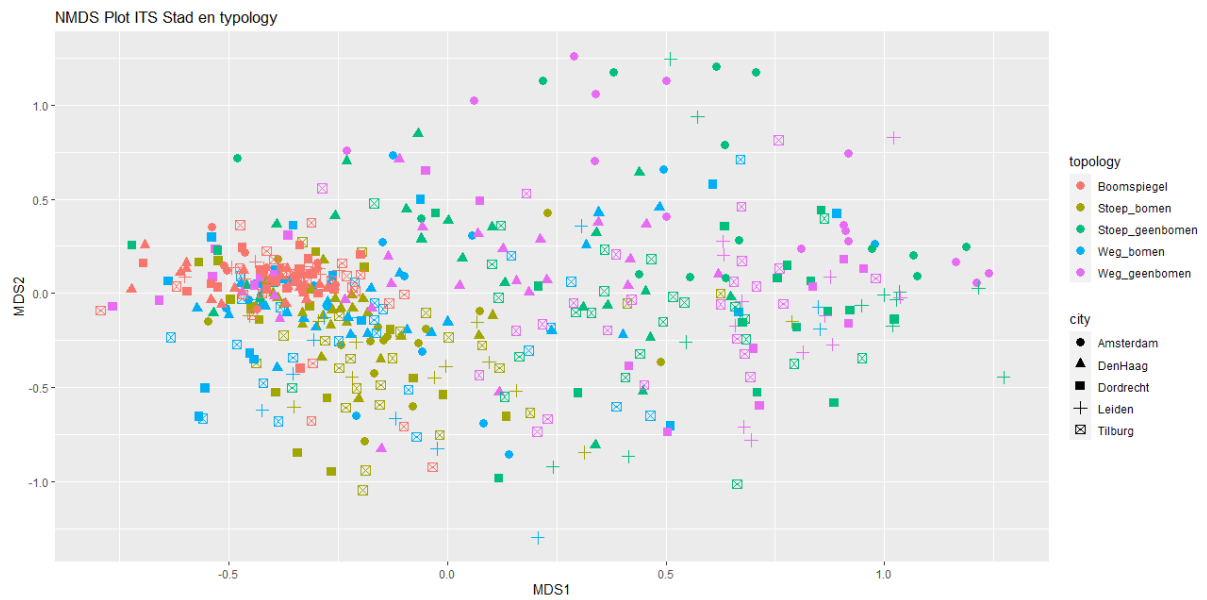
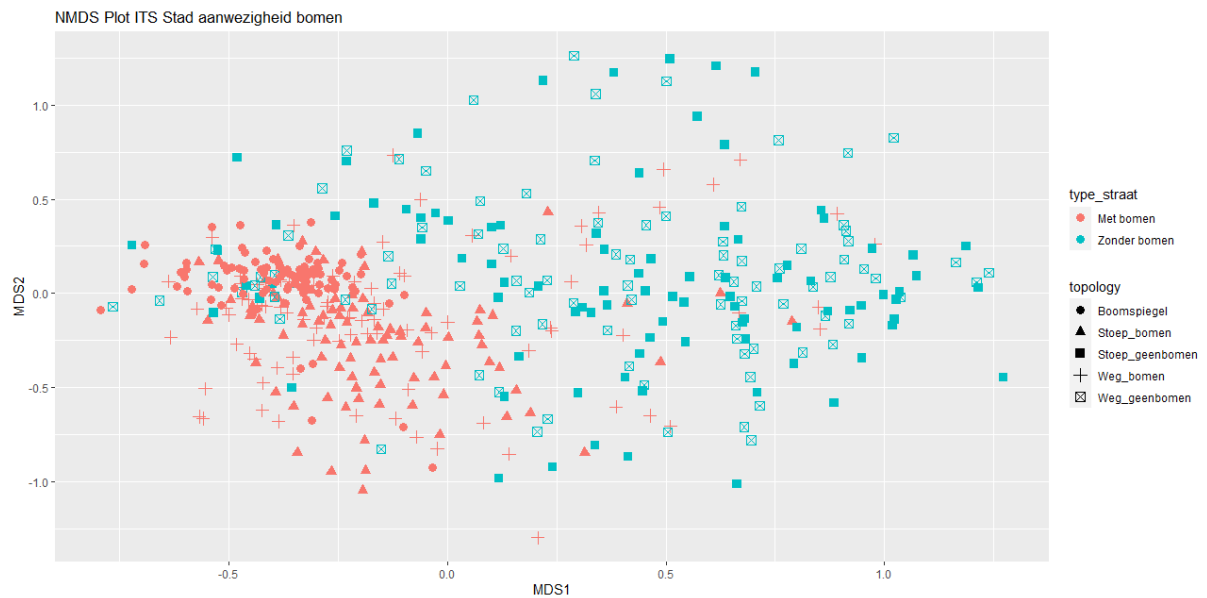


Figuur 8. NMDS analyse van de clustering van alle monsters volgens de diepere ondergrond, voor schimmels (A) en prokaryoten (B).

De diepere ondergrond lijkt geen duidelijke invloed te hebben op de diversiteit van de schimmels (figuur 8A). Voor de prokaryoten is de conclusie minder evident (figuur 8B). Ook al zitten de meeste monsters dicht op elkaar en is er overlap, lijkt er toch een zwakke scheiding te zijn tussen de meeste monsters op zand (linksboven in figuur 8B) en de monsters op klei of veen. Als de diepere ondergrond inderdaad doorwerkt naar de bodembiodiversiteit van de toplaag zal dat effect echter klein zijn, en voor de schimmels wellicht worden overschaduwd door de sterkere invloed van de bomen. Ook andere, locatie-specifieke factoren zoals de herkomst, geschiedenis en abiotische samenstelling van de bodem spelen waarschijnlijk een meer dominante rol. Dit zou voor een aantal locaties nader moeten worden onderzocht.

In de figuren 9 en 10 zijn de typologieën tegen elkaar afgezet op basis van de diversiteit van de schimmels en prokaryoten van elk monster. Figuur 9A laat zien dat de monsters uit de boomspiegels het dichtst bij elkaar staan. De diversiteit van schimmels van alle boomspiegels lijkt dus op elkaar en de schimmel gemeenschappen in de boomspiegel lijken stabiel te zijn dan in de andere typologieën. De meeste monsters van de stoep met bomen zitten redelijk dicht bij elkaar en tegen de monsters van de boomspiegel aan. Dit geldt ook voor een groot deel van de monsters van de weg met bomen, alhoewel hier de spreiding veel groter is. Deze verdeling is het gevolg van de invloed van de lindes op de diversiteit van schimmels in hun omgeving. Wanneer alleen onderscheid wordt gemaakt tussen monsters met of zonder bomen (figuur 9B) is dit patroon nog makkelijker te zien.

De grote spreiding van de monsters 'weg met bomen' zou verschillende oorzaken kunnen hebben. De positie van 'rode' monsters in de rechterhelft van figuur 9B zou kunnen komen door het verschil in afstand van de boom, doordat het in sommige straten moeilijk was om klinkers van de rijweg (en soms de stoep) op een uniforme afstand van de boom te trekken. Daarmee kan een verschil in de hoeveelheid (kleine) boomwortels verbonden zijn die in de monsters zijn meegenomen; minder wortels betekent minder invloed van de boom, waardoor de diversiteit meer op die zonder bomen zou kunnen lijken (zie ook figuur 12). Andersom zou de positie van 'blauwe' monsters in de linkerhelft van figuur 9B veroorzaakt kunnen worden door de invloed van andere vegetatie dan straatbomen in de buurt van de plek van monsternamen, of door lindes die verder weg stonden. Het laatste was het geval in Dordrecht - Steegoversloot, waar de monsters 'zonder bomen' in dezelfde straat werden genomen, op ca. 15–20 m afstand van de lindes. Het kan niet worden uitgesloten dat wortels van de lindes ook op deze afstand nog aanwezig waren. In Dordrecht - Hoge Nieuwstraat zijn de monsters wegens verbouwing op een plek genomen waar meer planten stonden, terwijl er in deze straat voor het grootste deel weinig tot geen vegetatie aanwezig is, ook niet achter de huizen.

A**B**

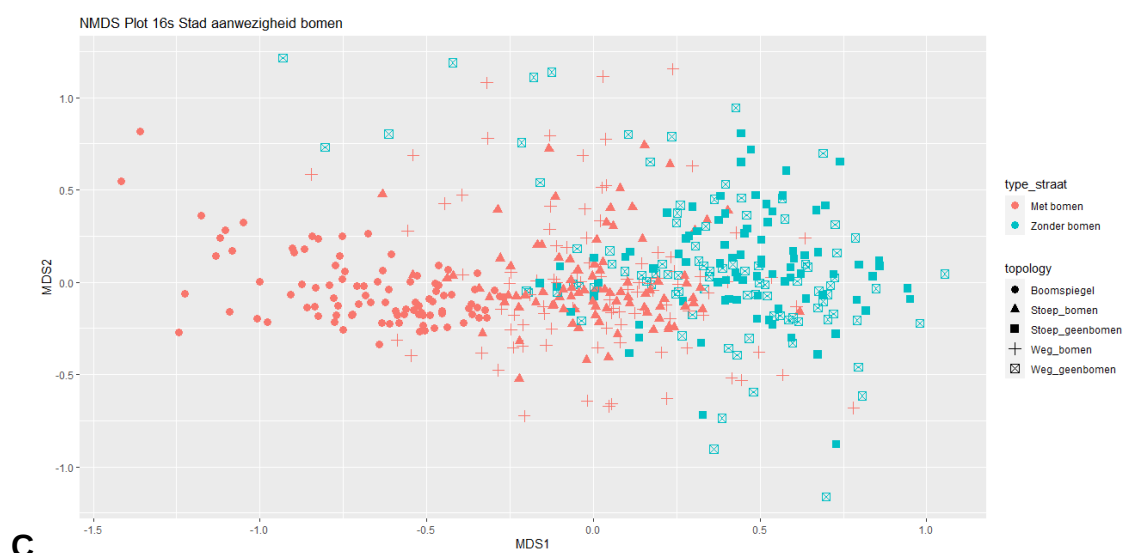
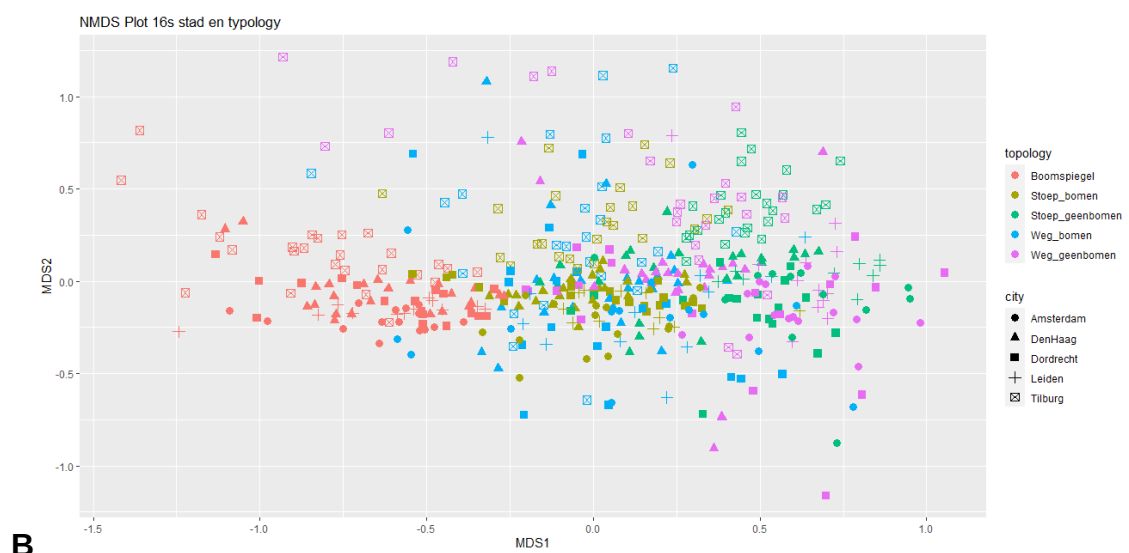
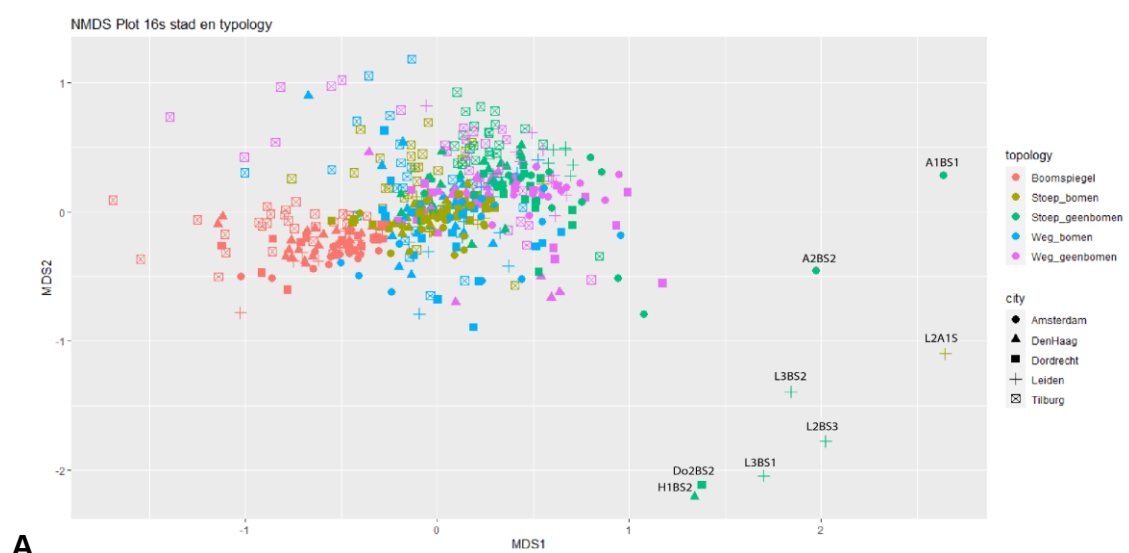
Figuur 9. NMDS analyse van relaties tussen typologieën, op basis van de ASV-diversiteit van schimmels per monster. A. De vijf typologieën zijn apart aangegeven. B. Alleen het verschil met of zonder bomen is aangegeven.

Wat de diversiteit van de prokaryoten betreft lijken bijna alle monsters veel dichter bij elkaar te staan (figuur 10A). Dit is echter het gevolg van een aantal outliers in de onderste rechterhelft van het diagram. Deze zijn afkomstig uit alle steden behalve Tilburg, en allemaal van onder de stoep (op een na alle onder de stoep zonder bomen). Waarom deze monsters zo duidelijk afwijken valt niet voor alle locaties te achterhalen. De diversiteit in monster A1BS1 (Amsterdam - Van Ostadestraat) zou kunnen zijn beïnvloed door een mierennest onder de stoep, en de drie monsters L3BS1–3 (Leiden - Atjehstraat) door herbestrating een aantal jaren geleden (volgens beelden op Google Maps). In de omgeving van het enige afwijkende monster dichtbij een linde (L2A1S, Leiden - Lage Morsweg) was redelijk veel lage vegetatie aanwezig, maar datzelfde geldt ook voor andere, minder afwijkende monsters. In de directe omgeving van het monster H1BS2 (Den Haag - Capadosestraat) was helemaal geen vegetatie aanwezig, maar een invloed van de achtertuinen, die vanwege hoge muren niet zichtbaar waren, kan niet worden uitgesloten.

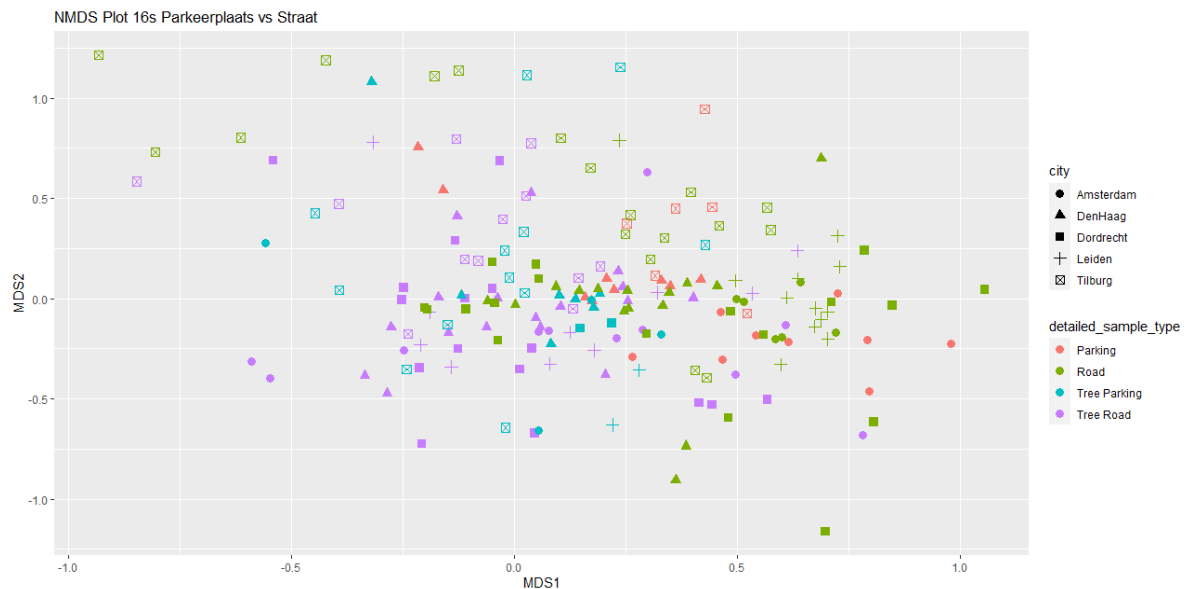
Wanneer dezelfde analyse wordt uitgevoerd zonder de outliers (figuur 10B en C), is de totale spreiding bij de schimmels en prokaryoten vergelijkbaar, te zien aan de schaal van de assen. Bij de prokaryoten staan de monsters van de boomspiegels iets verder af van de monsters van onder de bestrating dan bij de schimmels, en is er van links naar rechts een soort gradiënt van de boomspiegel, stoep en weg met bomen naar stoep en weg zonder bomen te zien. De spreiding van de monsters 'weg met bomen' is aanzienlijk kleiner dan bij de schimmels, terwijl de spreiding van de monsters 'weg zonder bomen' juist groter is. Deze resultaten duiden erop dat de bomen de diversiteit van de prokaryoten minder beïnvloeden dan andere factoren.

Volgende pagina:

Figuur 10. NMDS analyse van relaties tussen typologieën, op basis van de ASV-diversiteit van prokaryoten per monster. A/B. De vijf typologieën zijn apart aangegeven, met (A) en zonder (B) outliers. C. Alleen het verschil met of zonder bomen is aangegeven (analyse zonder outliers).

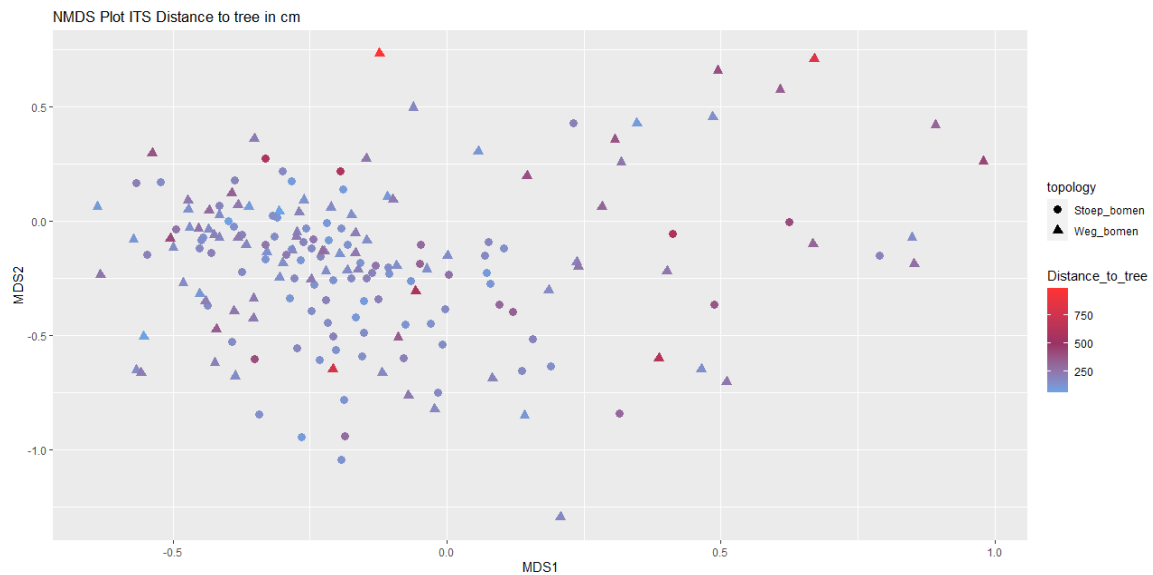
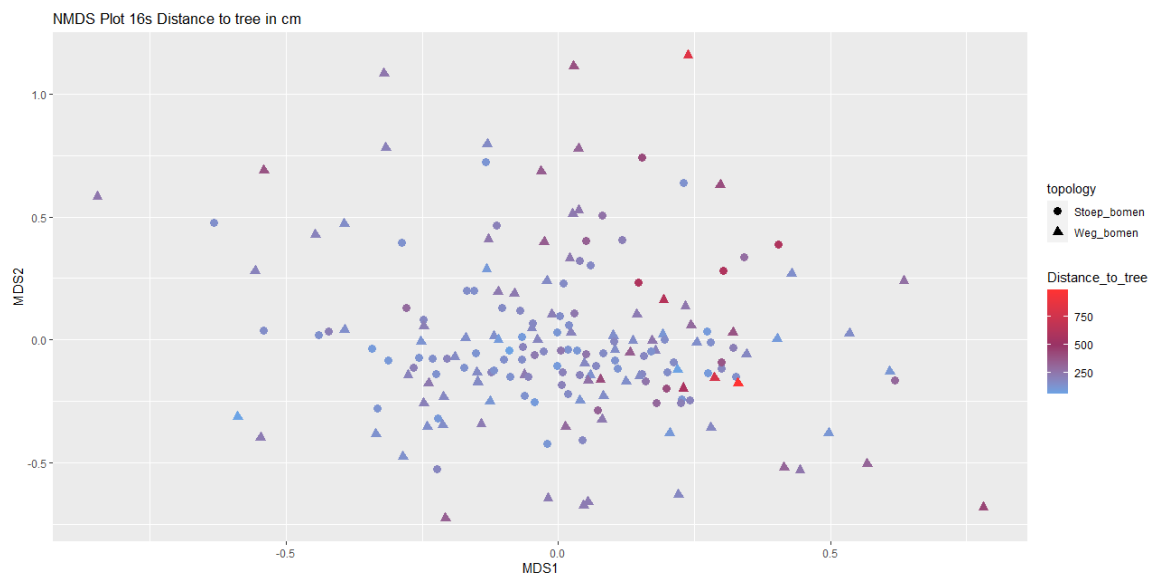


Het probleem om klinkers van de rijweg te liften leidde ertoe dat de monsters voor een (klein) deel van onder de parkeerstroken naast de rijweg genomen moesten worden. Hierdoor is wel een eerste analyse mogelijk om te bepalen of de biodiversiteit binnen dezelfde typologie verschilt wanneer er meer (rijweg) of minder (parkeerplaats) compactering door het verkeer aanwezig is. Dit lijkt niet het geval te zijn (figuur 11) maar verdere analyses zijn nodig van monsters die specifiek worden genomen om deze vraag te beantwoorden, waarbij ook de verkeersintensiteit per straat wordt meegenomen.



Figuur 11. NMDS analyse van de clustering van alle monsters van onder de weg (rijweg tegenover parkeerstrook), op basis van de diversiteit van prokaryoten.

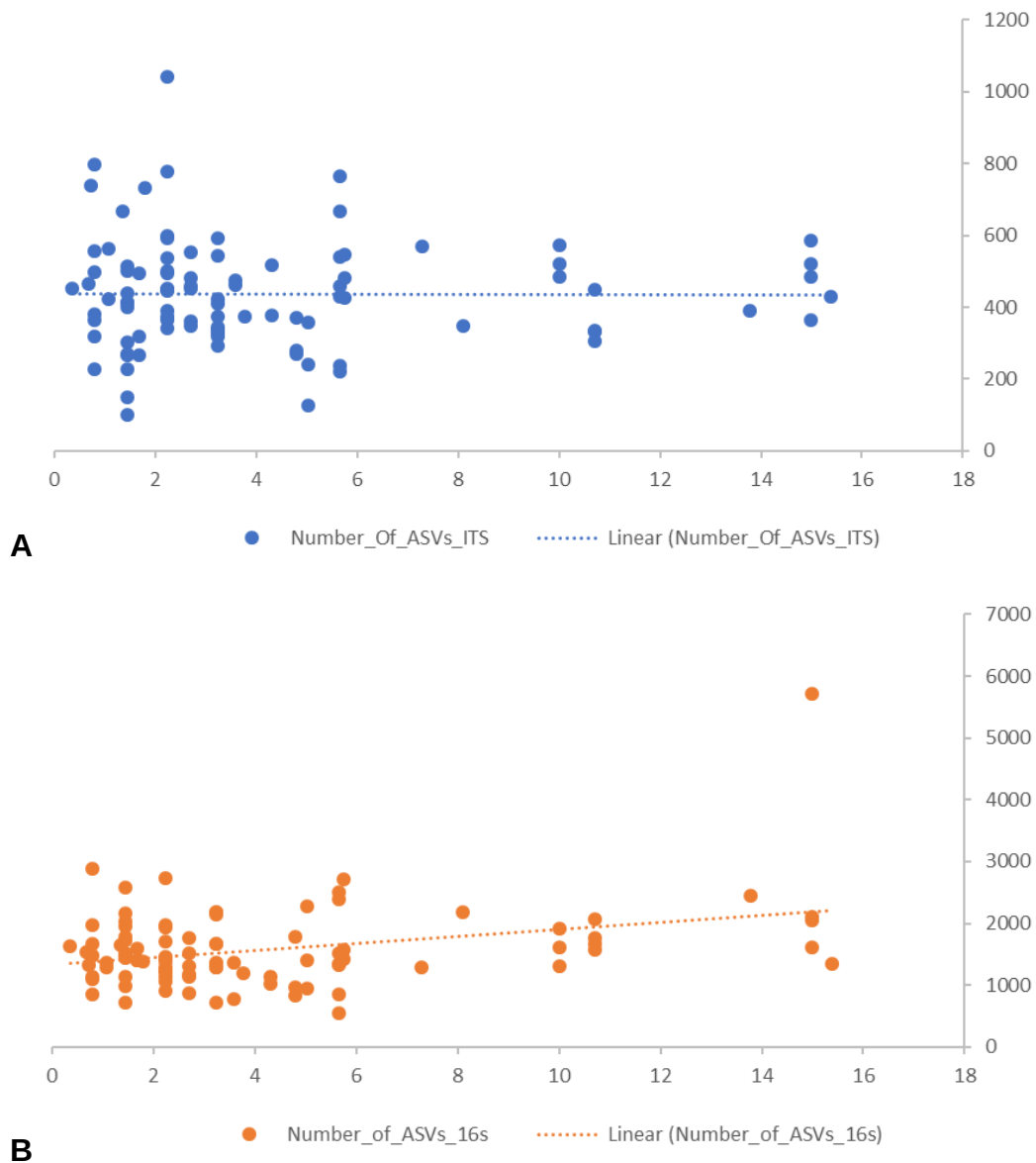
Een analyse om een mogelijk verband tussen het verschil in diversiteit en de afstand van de monsters tot de boom te vinden is in figuur 12 getoond. Bij de schimmels (figuur 12A) lijken meer monsters met een grotere afstand van de boom (rode symbolen) sterker af te wijken, terwijl de meeste monsters die dicht bij de boom zijn genomen (lichtblauwe symbolen) meer op elkaar lijken. Dit gaat echter niet voor alle monsters op; er zijn dus naast de afstand van de boom ook andere factoren die de diversiteit van schimmels beïnvloeden, bijvoorbeeld andere vegetatie. Bij de prokaryoten (figuur 12B) is er (nog) minder correlatie met de afstand tot de boom.

A**B**

Figuur 12. Clustering van de monsters van onder de stoep en weg in relatie tot de afstand van de boom (A - schimmels, B - prokaryoten).

Tenslotte werd gekeken naar een mogelijk verband tussen de grootte van de boomspiegel en de genetische diversiteit. Dit lijkt er op basis van de geanalyseerde monsters niet te zijn voor schimmels (figuur 13A) noch prokaryoten (figuur 13B). In hoeverre de taxonomische of functionele samenstelling verschilt met de grootte van de boomspiegel moet verder worden onderzocht. Kleine boomspiegels lijken wel meer van elkaar te verschillen qua aantallen ASV's. Dit zou kunnen betekenen dat in grotere boomspiegels een stabielere gemeenschap van micro-organismen aanwezig is die minder beïnvloed wordt van de (bestraatte) omgeving, maar kan ook het gevolg zijn van het relatief kleine aantal grote boomspiegels die in deze analyse zijn meegenomen. Ook is slechts één monster per boomspiegel

geanalyseerd en blijft de variatie binnen elke boomspiegel onbekend. Het effect hiervan is mogelijk zichtbaar bij de uitschieter met bijna 6000 ASV's in figuur 13B. Het gaat hier om een van de drie boomspiegels in Tilburg - Piusstraat die verbonden zijn met een grasveld en waar recentelijk opnieuw gras is uitgezaaid. Deze factoren kunnen in principe bijdragen aan een hogere diversiteit, maar de andere twee wijzen geen uitzonderlijk verhoogde aantallen ASV's op. Dit wijst erop dat de diversiteit op de specifieke plek van monsternamen nog door andere factoren wordt beïnvloed.



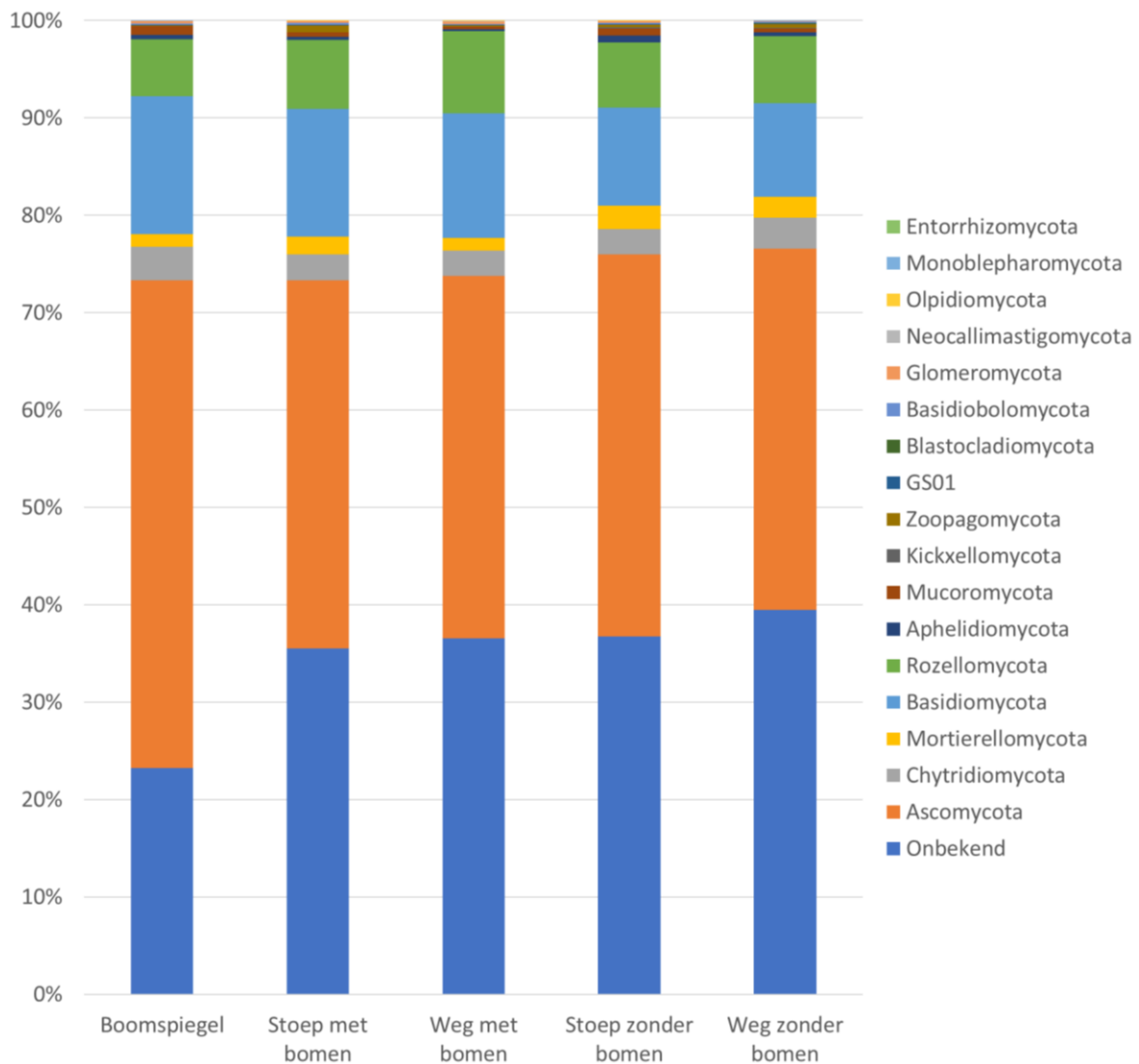
Figuur 13. Aantallen ASV's per grootte boomspiegels (A - schimmels, B - prokaryoten). Voor deze analyse zijn de boomspiegels in klassen ingedeeld. De grootte boven de 14 m is een schatting (boomspiegel verbonden met ander groen of doorlopend als een smalle 'berm').

3. Diversiteit binnen de schimmels, bacteriën en Archaea

De taxonomische diversiteit van de schimmels, en vooral van de bacteriën, in de onderzochte monsters is enorm en zal nog in detail verder worden onderzocht. Wij beperken ons hier tot een overzicht van de taxonomische hoofdgroepen (phyla) van de schimmels en bacteriën, met één van de phyla meer in detail als voorbeeld. Op phylum niveau lijken de patronen voor alle onderzochte typologieën weliswaar het meest op elkaar (de hoofdtaxa zijn overal aanwezig), maar zijn er al wel verschillen te zien qua relatieve verhoudingen tussen de groepen. De kleine groep van de Archaea wordt op het iets meer uitgediepte niveau van klassen besproken. De functionele diversiteit wordt alleen voor de schimmels meer in detail besproken, aan de hand van een grafiek op basis van de primaire leefwijze. Voor de bacteriën en Archaea worden mogelijke functies genoemd bij de discussie over de taxonomische diversiteit. Verdere analyses zullen moeten aantonen welke verschillen statistisch significant zijn en welke specifieke groepen en functies van schimmels en prokaryoten het meest kenmerkend zijn voor een bepaald type omgeving.

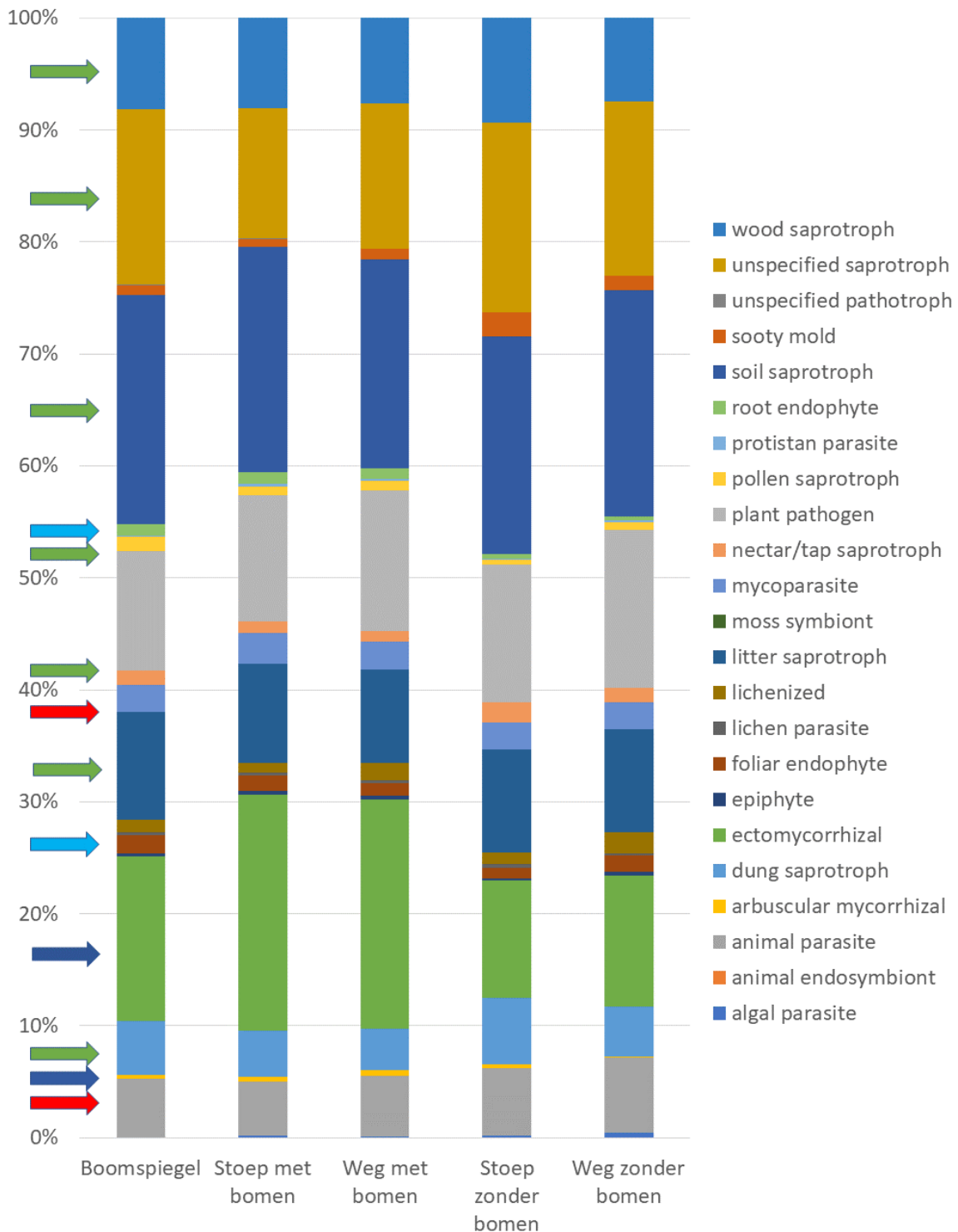
De relatieve verdeling van de schimmel ASV's op phylum niveau (figuur 14) komt grotendeels overeen met de typische samenstelling van de schimmeldiversiteit in bodems (James et al. 2020). Ascomycota is de grootste groep, gevolgd van Basidiomycota, Mucoromycota in brede zin (die in figuur 14 is opgesplitst in drie groepen, Glomeromycota, Mortierellomycota en Mucoromycota in nauwe zin volgens de taxonomische indeling die in de UNITE database wordt gebruikt), en Chytridiomycota. Ascomycota en Basidiomycota samen omvatten meer dan 95% van de totale bekende taxonomische diversiteit van schimmels wereldwijd en zijn ook ecologisch zeer divers. Het phylum Basidiomycota omvat onder andere de paddenstoelen vormende schimmels, waaronder de ectomycorrhiza schimmels die in symbiose leven met bomen zoals de linde (zie discussie bij figuur 15).

Opvallend is de relatief hoge abundantie van Rozellomycota en van schimmels die niet verder geclassificeerd kunnen worden. Voor zover bekend zijn Rozellomycota micro-schimmels die als parasieten in andere organismen leven; hun betekenis in (stads)bodems moet verder worden onderzocht. Het percentage onbekende schimmels bevestigt dat de bodembiodiversiteit in het urbane gebied onvoldoende bekend is; dit is niet verrassend gezien slechts ongeveer 1 % van alle betreffende wetenschappelijke studies gaan over bodems in de stad (Guilland et al. 2018). Dit lijkt vooral te gelden voor het microbiële leven onder de bestrating, waar het percentage niet geïdentificeerde schimmels het hoogst is.



Figuur 14. Relatieve taxonomische diversiteit schimmels (op phylum niveau).

Figuur 15 geeft weer hoe de diversiteit van schimmels zich vertaalt naar ecologische groepen. Weergegeven zijn de primaire leefwijze, zoals saprotroof (afbreken van dood organisch materiaal), parasitair/pathogeen (leven van andere levende organismen), endofytisch/epifytisch (leven in of op planten zonder deze aan te tasten), of in symbiose met andere organismen levend (mycorrhiza, korstmossen). Voor de meeste ASV's (bijna 50% in de boomspiegel tot >60% in de rijweg zonder bomen) is de leefwijze echter onbekend, wat te verwachten is aangezien een groot deel van de schimmel ASV's niet geïdentificeerd kon worden (figuur 14) en waarschijnlijk ook de ecologie van een deel van de geïdentificeerde schimmels onbekend is. De groep 'leefwijze onbekend' is in figuur 15 weggelaten, omdat de andere groepen anders moeilijk te onderscheiden zijn in de grafiek.



Figuur 15. Functionele diversiteit schimmels (primaire leefwijze) per typologie. In deze grafiek zijn alleen de ASV's van schimmels meegenomen waarvoor de leefwijze bekend is. De pijlen aan de linkerkant geven functionele groepen aan die in de tekst worden besproken.

De (relatief) meeste schimmels in de onderzochte bodems breken organisch materiaal af (groepen die met groene pijlen zijn aangeduid). Dat kunnen bijvoorbeeld afgestorven boomwortels zijn, bladeren die zijn blijven liggen, of andere plantendelen (pollenkorrels, zaden) die via de voegen ook onder de tegels

en klinkers terecht kunnen komen, daarnaast stoeplantjes of mossen die in de voegen groeien. Ook dode bodemdieren en uitwerpselen van dieren (bijv. honden) die in de bodem terechtkomen kunnen als substraat voor saprotrofe schimmels dienen. Parasitaire schimmels zijn in mindere mate aanwezig, dit zijn voornamelijk schimmels die op andere schimmels (bovenste rode pijl) of (bodem)dieren (onderste rode pijl) parasiteren. Plant-geassocieerde schimmels zijn onder andere mycorrhiza schimmels (donkerblauwe pijlen) en schimmels die endofytisch in plantenwortels of bladeren leven (lichtblauwe pijlen). De ectomycorrhiza schimmels (onderste donkerblauwe pijl) vormen de dominante groep. Zij zijn duidelijk meer aanwezig op de locaties met bomen. In absolute aantallen zijn er 846/925/870 verschillende ASV's gevonden in de boomspiegels/stoep met bomen/weg met bomen tegenover 318/346 ASV's in de stoep/weg zonder bomen. De ectomycorrhiza schimmels geven voornamelijk de aanwezigheid van de lindes weer, waarbij de meeste boomwortels niet in de boomspiegel maar juist verder af onder de bestrating zitten. Hetzelfde geldt waarschijnlijk ook voor de wortel endofyten (bovenste lichtblauwe pijl). De aanwezigheid van arbusculaire mycorrhiza schimmels (onderste donkerblauwe pijl) en het feit dat ectomycorrhiza schimmels en endofytische schimmels in mindere mate overal aanwezig duidt erop dat soms ook andere planten in de omgeving van de bemonsterde locaties of schimmelsporen zijn gesequencet. Dit kunnen bijvoorbeeld lindes op grotere afstand zijn, of planten in de boomspiegels, tuinen of tussen de bestrating.

De diversiteit van de bacteriën is zelfs wat de hoofdgroepen betreft duidelijk groter dan die van de schimmels, met ongeveer 60 phyla in deze dataset (figuur 16, phyla met <1% abundantie zijn samengevoegd tot een categorie 'overig'). De classificatie van bacteriën is verder nog veel meer in beweging; niet alle phyla hebben officiële namen en er komen nog steeds groepen bij die door middel van moleculaire analyse worden ontdekt. Ook zijn vaak alleen van een klein deel van de diversiteit per hoofdgroep verdere eigenschappen bekend; dit zijn vooral soorten die gekweekt en dan morfologisch en fysiologisch verder onderzocht kunnen worden.

Kenmerkend voor de toplaag van begroeide bodems (natuurlijke ecosystemen en landbouwbodems) is volgens Madigan et al. (2022) het dominante voorkomen van Proteobacteria, gevolgd van Acidobacteria en Bacteroidota. Deze drie phyla vormen samen ongeveer 60% van de diversiteit. Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobiota en Planctomycetota zijn eveneens met een noemenswaardige diversiteit vertegenwoordigd (samen ongeveer 15%). Kleinere groepen en ongeclassificeerde bacteriën vormen samen met Archaea de laatste ongeveer 25% van de diversiteit van prokaryoten.

De resultaten in figuur 16 zijn niet een op een vergelijkbaar met Madigan et al. (2020) omdat hun cijfers gebaseerd zijn op OTUs ("soorten"; sequenties die minder dan 3% van elkaar verschillen zijn geclusterd) en niet op ASV's. Maar ook in de onderzochte Nederlandse stadsbodems zijn Proteobacteria relatief het meest vertegenwoordigd en dragen de phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidota, Firmicutes, Planctomycetota en Verrucomicrobiota substantieel bij aan de

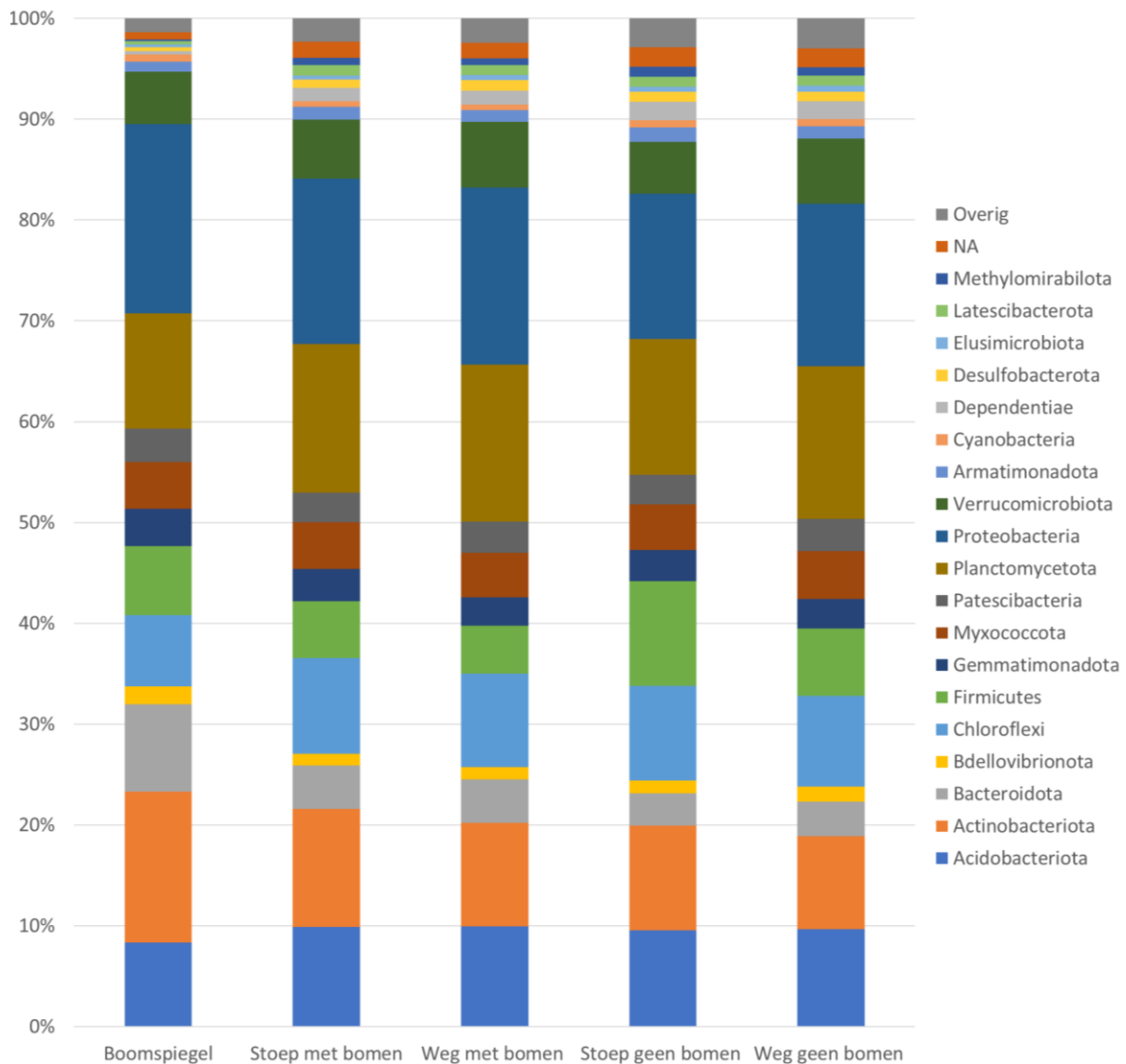
diversiteit. Het onderzoek van Yu et al. (2019) en Hu et al. (2021) naar de invloed van drie boomsoorten en verschillende typen bestrating in Zhangtou (Beijing, China) is wel gebaseerd zijn op ASV's, maar de verhoudingen tussen de meest voorkomende phyla verschilt duidelijk van die in figuur 16. Bijvoorbeeld is de relatieve diversiteit van Actinobacteria in de bovenste laag van de bodem in de Chinese studies veel groter, terwijl in ons onderzoek Planctomycetota en Firmicutes in verhouding meer vertegenwoordigd zijn. Bij het onderzoek van Yu et al. (2019) en Hu et al. (2021) gaat het echter om experimenten die zijn opgezet op voormalige landbouwgrond, dus een andere bodemtype en geschiedenis dan in de Nederlandse straat situatie. Andere studies hebben al aangetoond dat de diversiteit van Planctomycetota in verschillende bodems heel variabel is en kan oplopen tot een kwart van de totale bacteriële diversiteit (referenties in Wiegand et al. 2018).

Een ander phylum met opvallende verschillen is Chloroflexi, waarbij de verschillen vooral tussen Yu et al. (2019) enerzijds en zowel Hu et al. (2021) als ons onderzoek anderzijds te vinden zijn. De oorzaak van het afwijkende patroon in Yu et al. (2019) is niet duidelijk. Chloroflexi wordt hieronder verder uitgelicht als voorbeeld van een meer gedetailleerde analyse binnen een phylum.

Sterker nog dan bij de schimmels (figuur 14) zien we bij de bacteriën een verschil tussen de boomspiegel en de bestrate typologieën. Zo zijn de phyla Actinobacteria en Bacteroidota in de boomspiegels meer vertegenwoordigd, Planctomycetota en een aantal kleinere groepen (Dependentiae, Latescibacteriota, Methyloimbricota) daarentegen minder. In Yu et al. (2019) zijn eveneens verschillen te zien tussen open grond, doorlatende en niet-doorlatende bestrating. Deze komen echter niet overeen met de Nederlandse resultaten, zoals juist in verhouding minder Acidobacteria en meer Gemmatimonadetes in de open grond; het laatste phylum is in figuur 16 overal ongeveer evenveel vertegenwoordigd. De specifieke verschillen zouden kunnen afhangen van het type bodem of andere factoren, maar de conclusie dat bestrating leidt tot een verandering van de bacteriële diversiteit (Yu et al. 2019), en dat dit effect voor bacteriën sterker is dan de aanwezigheid van bomen (Hu et al. 2021), wordt bevestigd.

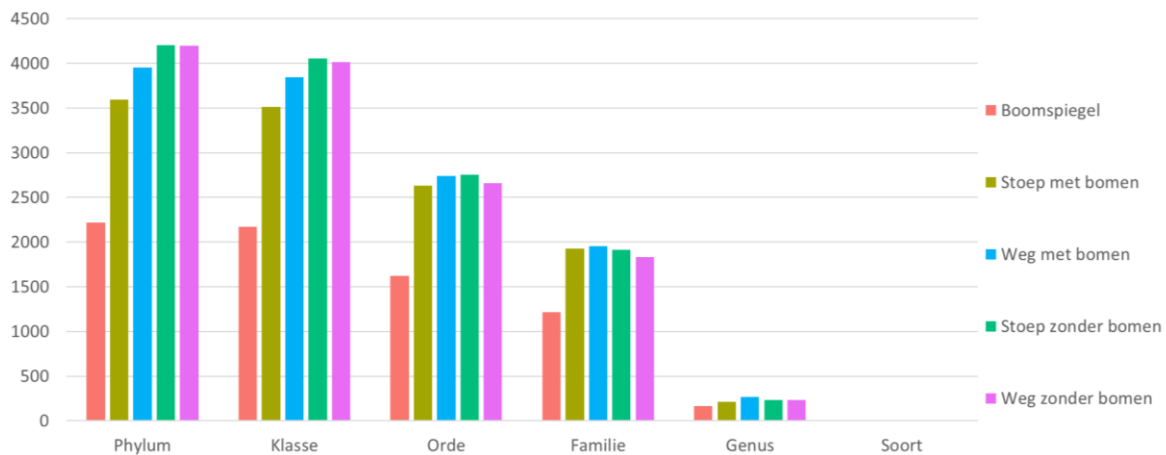
Verder is aan te merken dat het aandeel van geheel onbekende bacteriën veel kleiner is dan bij de schimmels; er leven dus relatief weinig bacteriën in de onderzochte bodems die nog niet in een van de bestaande phyla zijn geplaatst.

Het bepalen van ecologische functies op phylumniveau is problematisch omdat een phylum meestal een brede variatie van soorten met verschillende functies heeft. Zo kunnen bij bacteriën in hetzelfde phylum veel verschillende types van leefwijze en metabolisme voorkomen die iets zeggen over de omgeving, waardoor er overlap is tussen de phyla. Tot het phylum Chloroflexi horen bijvoorbeeld bacteriën die in aërobe (met zuurstof) en anaërobe (zonder zuurstof) omgeving leven, deels bij hoge temperaturen, deels met zonlicht energie opwekken en deels gehalogeneerde organische stoffen (zowel natuurlijke organohalogenen als antropogene chemicaliën) kunnen gebruiken voor hun energiewinning (Krzmarzick et al. 2012).



Figuur 16. Relatieve taxonomische diversiteit van de bacteriën (phylumniveau).

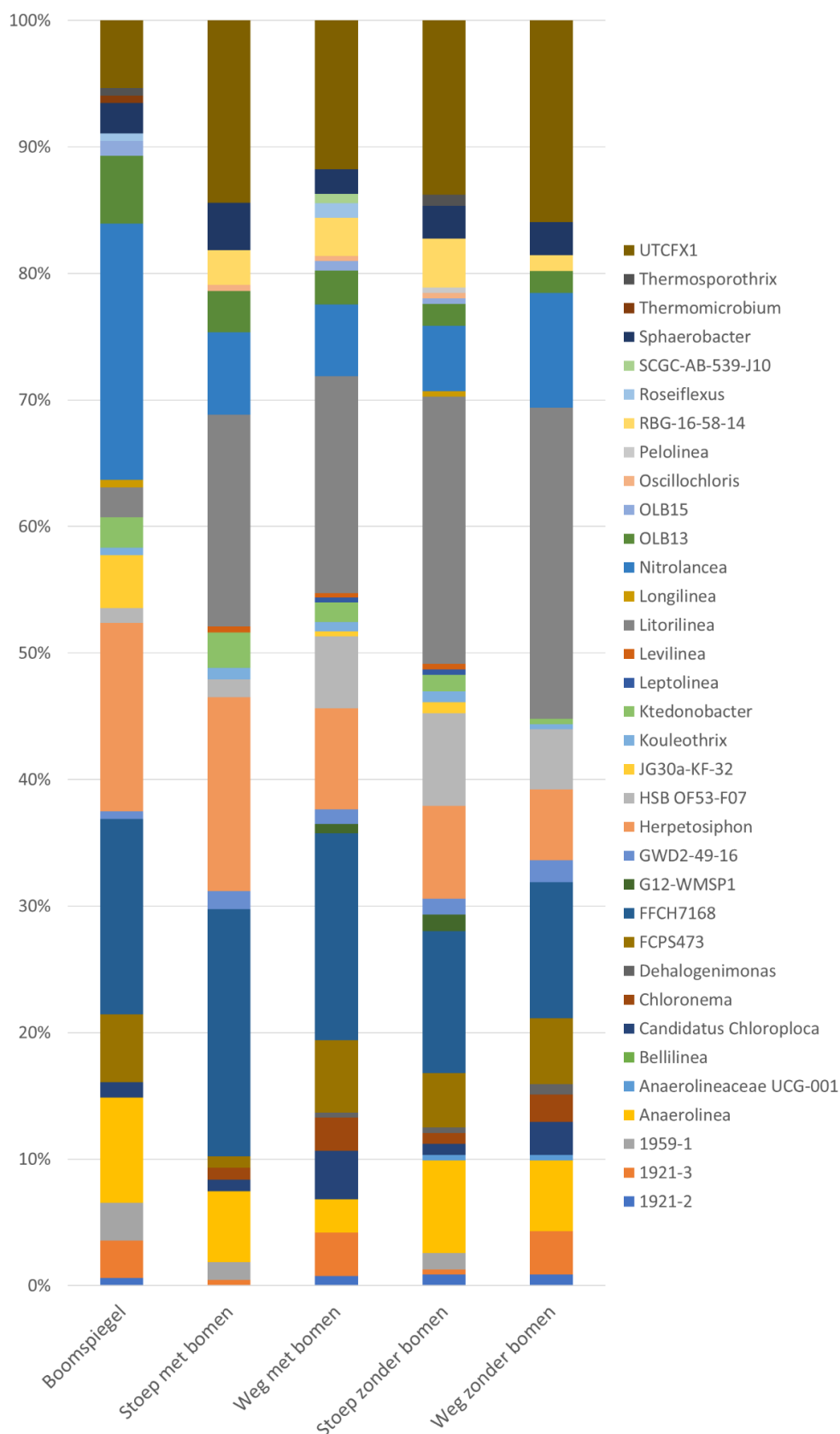
De vraag welke leefwijzen en functies in de stadsbodems vertegenwoordigd zijn, en waardoor de verschillen tussen de typologieën tot stand komen, vergt een analyse op lager taxonomisch niveau, voor zover dat op basis van geïdentificeerde ASV's mogelijk is. Een bijkomend probleem is dat veel soorten nog steeds onbekend zijn en informatie over functies afkomstig is van een klein aantal geïdentificeerde en gekarakteriseerde soorten. Zoals figuur 17 toont voor het phylum Chloroflexi kunnen de meeste ASV's wel tot phylum en klasse binnen het phylum worden geïdentificeerd, maar heel weinig ASV's tot soort (slechts 2 van >4000 ASV's) of zelfs tot het genus waar de soort bij hoort.



Figuur 17. Het aantal ASV's van het phylum Chloroflexi dat per typologie op verschillende niveaus gedetermineerd kan worden.

Op genusniveau (figuur 18) valt vooral op dat de boomspiegel anders is dan de bedekte typologieën. Twee genera met tegenovergestelde patronen zijn *Nitrolancea* (grote relatieve abundantie in de boomspiegel) en *Litorilinea* (grote relatieve abundantie in de bedekte typologieën). Van *Nitrolancea* zijn slechts enkele soorten bekend. De eerste die beschreven is is *Nitrolancea hollandica*, gevonden in een nitrification bioreactor in Rotterdam (Sorokin et al. 2014). Deze is aëroob en gebruikt nitriet/formiaat als stikstofbron en CO₂ als koolstofbron. Hierna zijn verwanten ook op andere locaties aangetroffen die veel nitriet/ammonium hebben, zoals bioreactors of geothermale bronnen (Spieck et al. 2020). De hogere abundantie in de boomspiegels zou een gevolg kunnen zijn van overmatige stikstofdepositie, als deze een meer directe invloed heeft op open bodem dan op bodem onder de bestrating. De soorten die bekend zijn binnen het genus *Litorilinea* zijn eveneens aëroob en leven bij hoge temperaturen en substraten met een neutrale tot basische pH (Kale et al. 2013), dit komt overeen met pH-waarden die we in een eerdere proef bij grondmonsters onder de bestrating hebben gemeten.

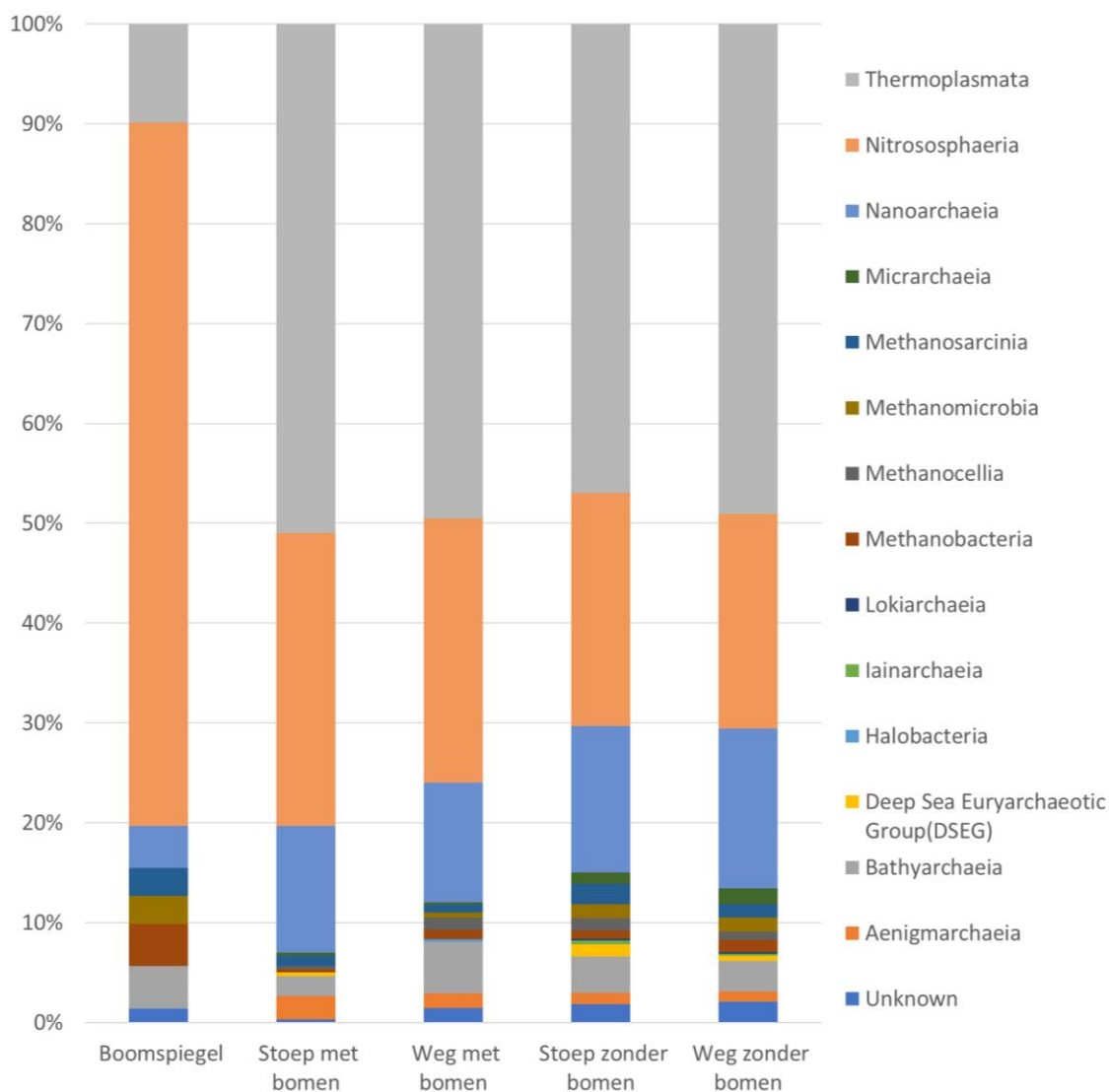
Wat de diversiteit van de Archaea (figuur 19) betreft valt vooral de dominante aanwezigheid van de klasse Nitrososphaeria in de boomspiegels op, terwijl deze onder de bestrating veel minder divers is. Nitrososphaeria is de meest wijdverspreide klasse van de Archaea, omdat vertegenwoordigers van deze klasse in vrijwel elk habitat, zowel in extreme als gematigde omgevingen, kunnen leven (Kerou et al. 2016). Alle tot nu toe gecultiveerde Nitrososphaeria leven in aërobe omstandigheden en hebben ammoniak nodig voor hun stofwisseling (Kerou et al. 2016). In landbouwbodems lijkt de klasse Nitrososphaeria eveneens het meest aanwezig te zijn, gevolgd van de klasse Thermoplasmata (Saghaï et al. 2022) die in de monsters onder de bestrating het meest dominant was (figuur 19).



Figuur 18. Verhoudingen van het aantal ASV's van Chloroflexi op genus niveau. Deze maken 8% van het totale aantal Chloroflexi ASV's uit (de 92% niet geïdentificeerde ASV's zijn weggelaten).

Ten minste een deel van de Thermoplasmata prefereert zure omstandigheden en hoge temperaturen, maar de ecologie van deze groep is waarschijnlijk nog niet geheel bekend. Sommige vertegenwoordigers kunnen mogelijk ammoniak oxideren, zoals ook de Nitrososphaeria (Diamond et al. 2022); dit past bij het voorkomen in (stikstofrijke) bodems. Een andere klasse waarvan de diversiteit in de boomspiegel duidelijk afwijkt van die onder de bestrating is de Nanoarchaeia, behorend tot een groep van Archaea die pas 20 jaar geleden zijn beschreven van onderzeese hete bronnen (Huber et al. 2002) en onlangs ook zijn gevonden in radioactieve afvalputten in Australië (Vázquez-Campos et al. 2021). Wat het voorkomen van Nanoarchaeia in stedelijke bodems betekent is nog onduidelijk.

De duidelijke verschillen in diversiteit laat vermoeden dat de omstandigheden in de bodem van de boomspiegels en onder de bestrating heel verschillend zijn, maar hoe precies moet verder worden onderzocht.



Figuur 19. Relatieve taxonomische diversiteit van de Archaea (klasse niveau).

Conclusies

Dit onderzoek geeft voor het eerst op grotere schaal inzicht in de bodembiodiversiteit van zowel schimmels als prokaryoten in straten van Nederlandse steden. De resultaten bevestigen het gebruik van DNA metabarcoding als een krachtige tool om de bodembiodiversiteit in urbane habitats in kaart te brengen, tot aan het leven onder de bestrating toe. Het onderzoek heeft een enorme hoeveelheid gegevens opgeleverd. De eerste analyses die in dit rapport zijn beschreven laten al zien dat de microbiële biodiversiteit niet toevallig verdeeld is maar dat er patronen te zien zijn die veroorzaakt worden door bekende, maar deels ook door (nog) onbekende of niet gemeten factoren. De gegevens zullen de komende tijd verder geanalyseerd worden, onder andere d.m.v. tests voor statistische onderbouwing van de resultaten, een factoranalyse van de invloed van de bekende omgevingsfactoren en gedetailleerde analyses van taxonomische en functionele diversiteit op lager taxonomisch niveau. Een algemeen probleem wat betreft de interpretatie van ecologische functies is het feit dat veel gedetecteerde sequenties helemaal niet of alleen tot op hoog taxonomisch niveau geïdentificeerd kunnen worden. Van veel schimmels en prokaryoten is dus niet bekend om welke soorten het gaat en wat precies hun ecologische rol is in het ecosysteem. Toch verwachten we dat het mogelijk is om met de bestaande data - tot op zekere hoogte - groepen te identificeren die iets zeggen over de toestand van de bodem (bioindicatoren voor specifieke vragen volgens Fierer et al. 2021, zoals de hoeveelheid pathogenen).

Op basis van de tot nu toe uitgevoerde analyses kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- Ook in kunstmatig aangebrachte stedelijke bodems is een grote microbiële biodiversiteit te vinden, met een voor bodems typische samenstelling van hoofdgroepen van schimmels en prokaryoten.
- De toegepaste strategie van bemonstering geeft een goed beeld van de diversiteit en verhoudingen van schimmels en prokaryoten, maar om de volledige biodiversiteit van een stad te vangen is er een nog diepere sampling nodig.
- In vergelijking met studies van andere bodemsystemen lijkt de diversiteit van alle onderzochte locaties op elkaar, d.w.z. dat er ondanks de verschillen tussen typologieën en individuele monsters een microbiële gemeenschap aanwezig lijkt te zijn die kenmerkend is voor de in Nederlandse straten gebruikte bodem(s).
- De diepere ondergrond heeft weinig tot geen invloed op de microbiële biodiversiteit van de toplaag van de bodem.
- De grondmonsters uit verschillende typologieën lijken over het algemeen meer op elkaar dan grondmonsters uit andere typologieën uit dezelfde stad, vooral wat de boomspiegel betreft (bv. twee grondmonsters die 1 m uit elkaar worden genomen in verschillende typologieën lijken minder op elkaar

dan grondmonsters die beide in de boomspiegel worden genomen op 90 km afstand).

- Voor de diversiteit van schimmels is de aan- of afwezigheid van straatbomen een belangrijke factor. De ratio schimmels:bacteriën is groter in straten waar bomen staan, ook onder de stoep en de weg.
- Voor de diversiteit van prokaryoten (bacteriën en Archaea) spelen andere factoren een grotere rol, zoals open grond versus bestrating en verschillende grondsoorten onder de stoep en rijweg, maar speelt ook de aan- of afwezigheid van bomen mee.
- De aanwezigheid van straatbomen (en waarschijnlijk ook andere vegetatie in de boomspiegels) leidt tot een grotere diversiteit, omdat er naast veel bacteriën ook meer verschillende schimmels aanwezig zijn. Daardoor zijn meer ecologische functies vertegenwoordigd (zoals de mogelijkheid om organische stofresten via verschillende metabolische pathways om te zetten), en deze functies kunnen worden waargenomen door meer verschillende organismen. Het is aannemelijk dat deze hogere mate van redundantie de bodem weerbaarder maakt tegen omgevingsstress, zoals extreme droogte (zie ook Van der Putten et al. 2019).
- De grootte van de boomspiegel en verschillende mate van compactering binnen dezelfde typologie (weg: parkeerstrook versus rijbaan) lijkt geen duidelijk effect te hebben op de microbiële diversiteit.
- De meeste schimmels in de onderzochte bodems breken organisch materiaal af. In de CDOR brochure *Tips voor een gezonde bodem 2023* wordt al aanbevolen om organisch materiaal te laten liggen waar het kan. Naast andere voordelen voor de bodem is dat materiaal ook belangrijk als 'voedsel' voor een grote diversiteit aan schimmels.

Daarnaast kunnen een aantal groepen micro-organismen mogelijk worden gebruikt als bioindicatoren van bepaalde condities van stedelijke bodems, zoals de aan- of afwezigheid van mycorrhizaschimmels, of Archaea als indicator voor "extreme" omstandigheden in stedelijke bodems (significant meer aanwezig onder de bestrating). Hiervoor is verder onderzoek nodig op lager taxonomisch niveau, om specifieke taxa en hun functies te kunnen gebruiken die duidelijk verschillen in hun abundantie onder bepaalde omstandigheden, zoals aangeduid voor het genus *Nitrolancea* van het phylum Chloroflexi.

Naast verder te gaan met analyses van de bestaande data is op verschillende vlakken vervolgonderzoek nodig. Een deel van de gevonden patronen zal te verklaren zijn door factoren die niet zijn meegenomen in dit onderzoek, zoals variatie in de herkomst, geschiedenis en chemische samenstelling van de bodem. Om de volledige biodiversiteit van een stad te bepalen is er een nog diepere bemonstering nodig, op kleine schaal binnen de al bemonsterde typologieën (bijvoorbeeld variatie binnen boomspiegels), in meer verschillende typologieën en gebruiksdoelen (doorlatende bestrating, parkeerplaatsen, speeltuinen, bermen ed.) en in verband met verschillende types vegetatie, substraten voor bomen en meer

‘natuurlijke’ stedelijke habitats. Ook zou het wenselijk zijn om het totale voedselweb in stedelijke bodems in kaart te brengen en zo de microbiële biodiversiteit te kunnen vergelijken met andere groepen organismen zoals bodemdieren. Een aantal van deze vraagstukken worden al bewerkt, of zullen nog worden aangegaan, in het project HiddenBiodiversity (“iepenexperiment” van gemeente Amsterdam met verschillende substraten voor bomen, invloed van berm versus boomspiegel en van verschillende boomsoorten op de microbiële diversiteit, ecologie van bodemdieren in de stad).

Ten slotte is het belangrijk om samen met de bij de CDOR betrokken gemeenten te overleggen hoe de nieuw opgedane kennis over bodembiodiversiteit gebruikt en toegepast kan worden, i.h.b. welke indices ontwikkeld moeten worden om specifieke kenmerken van bodemgezondheid te meten en toe te passen op specifieke gebruiksdoelen.

Geciteerde literatuur

- Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson K-H, et al. 2023. The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered. *Nucleic Acids Research*, gkad1039. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1039>
- Callahan B, McMurdie P, Rosen M. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan B, McMurdie P, Holmes S. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11: 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sande EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM. 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* 84: 45–67. <https://doi.org/10.1890/13-0133.1>
- Diamond S, Lavy A, Crits-Christoph A, Matheus Carnevali PB, Sharrar A, Williams KH, Banfield JF. 2022. Soils and sediments host Thermoplasmata archaea encoding novel copper membrane monooxygenases (CuMMOs). *The ISME Journal* 16: 1348–1362. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01177-5>
- Fierer N, Wood SA, Bueno de Mesquita CP. 2021. How microbes can, and cannot, be used to assess soil health. *Soil Biology and Biochemistry* 153: 108111. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108111>
- Gao CH, Yu G, Cai P. 2021. ggVennDiagram: An Intuitive, Easy-to-Use, and Highly Customizable R Package to Generate Venn Diagram. *Frontiers in Genetics* 12: 706907. doi: 10.3389/fgene.2021.706907.
- Guilland C, Maron PA, Damas O, Ranjard L. 2018. Biodiversity of urban soils for sustainable cities. *Environmental Chemistry Letters*, 16: 1267–1282.
- Hu Y, Yu W, Cui B, Chen Y, Zheng H, Wang X. 2021. Pavement Overrides the Effects of Tree Species on Soil Bacterial Communities. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18: 2168. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042168>
- Huber H, Hohn M, Rachel R. et al. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63–67. <https://doi.org/10.1038/417063a>
- James TY, Stajich JE, Hittinger CT, Rokas A. 2020. Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. *Annual Review of Microbiology* 74: 291–313.
- Kale V, Björnsdóttir SH, Friðjónsson ÓH, Pétursdóttir SK, Omarsdóttir S, Hreggviðsson GÓ. 2013. *Litorilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., an aerobic member of the class Caldilineae, phylum Chloroflexi, isolated from an intertidal

- hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(3): 1149–1154.
- Kerou M, Eloy Alves RJ, Schleper C. 2016. Thaumarchaeota / Nitrososphaeria. In: Whitman WB, DeVos P, Chun J, Dedysh S, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey F, Trujillo M. (eds.) *Bergey's manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken, New Jersey
- Köljalg U, Nilsson HR, Schigel D, et al. 2020. The Taxon Hypothesis Paradigm—On the Unambiguous Detection and Communication of Taxa. *Microorganisms* 8(12): 1910. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121910>
- Krzmarzick MJ, Crary BB, Harding JJ, Oyerinde OO, Leri AC, Myneni SCB, Novak PJ. 2012. Natural Niche for Organohalide-Respiring Chloroflexi. *Applied and Environmental Microbiology* 78(2): 393–401. <https://doi.org/10.1128/AEM.06510-11>
- Louca S, Parfrey LW, Doebeli M. (2016) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* 353: 1272–1277.
- Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. 2022. *Brock Biology of Microorganisms*, 16th ed, Global Edition. Pearson Education, 1124 pp.
- Oksanen FJ, Blanchet FJ, Kindt R, et al. 2017. *Vegan: Community Ecology Package*. R package Version 2.4-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pölme S, Abarenkov K, Nilsson, HR. et al. 2020. FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal Diversity* 105: 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00466-2>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41(D1): D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team. 2022. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Saghai A, Banjeree S, Degruene F, et al. 2022. Diversity of archaea and niche preferences among putative ammonia-oxidizing Nitrososphaeria dominating across European arable soils. *Environmental Microbiology* 24(1): 341–356. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15830>
- Sorokin DY, Vejmekova D, Lückner S, et al. 2014. *Nitrolancea hollandica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium isolated from a bioreactor belonging to the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(6): 1859–1865. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062232-0>
- Spieck E, Sass K, Keuter S, Hirschmann S, Spohn M, Indenbirken D, Kop LFM, Lückner S, Giaveno, A. 2020. Defining culture conditions for the hidden nitrite-

- oxidizing bacterium *Nitrolancea*. *Frontiers in Microbiology* 11: 1522.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01522>
- Tedersoo L, Bahram M, Zinger L, Nilsson RH, Kennedy PG, Yang T, Anslan S, Mikryukov V. 2022. Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology* 31(10): 2769–2795.
<https://doi.org/10.1111/mec.16460>
- Van der Putten W. 2019. Bodembiodiversiteit in Nederlandse landbouw, bos en (droge) natuur. Fact finding paper voor de Raad voor Leefomgeving en Infrastructuur (RLI) voor het advies Vitale Bodem, onderwerp Bodembiodiversiteit. Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO-KNAW), 33 pp.
- Vázquez-Campos X, Kinsela AS, Bligh MW, Payne TE, Wilkins MR, Waite TD. 2021. Genomic Insights Into the Archaea Inhabiting an Australian Radioactive Legacy Site. *Frontier in Microbiology* 12: 732575.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732575>
- Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, et al. 2015. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 1(1): e00009-15.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15>
- Wiegand S, Jogler M, Jogler C. 2018. On the maverick Planctomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 42(6): 739–760. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy029>
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO. 2014. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 42(D1): D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yu W, Hu Y, Cui B, Chen Y, Wang X. 2019. The Effects of Pavement Types on Soil Bacterial Communities across Different Depths. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 1805.
<https://doi.org/10.3390/ijerph16101805>

Bijlage 1. Overzicht van het aantal monsters (M) en de aantallen en percentages verschillende DNA sequenties (ASV's) van schimmels (S) en prokaryoten (P) per typologie en stad.

	M	ASV's S	Gemiddeld unieke ASV's S per M	ASV's P	Gemiddeld unieke ASV's P per M	ASV's totaal	Gemiddeld uniek per M	% S	% P
Boomspiegel totaal	95	11312	119	31880	336	43192	455	26%	74%
Onder de stoep met bomen	93	10751	116	38164	410	48915	526	22%	78%
Onder de weg met bomen	93	10860	117	43255	465	54115	582	20%	80%
Totaal in straten met bomen	281	23493	84	77672	276	101165	360	23%	77%
Onder de stoep zonder bomen	93	7505	81	45052	484	52557	565	14%	86%
Onder de weg zonder bomen	93	7945	85	46943	505	54888	590	14%	86%
Totaal in straten zonder bomen	186	12912	69	69572	374	82484	443	16%	84%
Onder de stoep totaal	186	15464	83	64087	345	79551	428	19%	81%
Onder de weg totaal	186	15739	85	69101	372	84840	456	19%	81%
Amsterdam (A) totaal	75	7697	103	33773	450	41470	553	19%	81%
A - boomspiegel	15	3522	235	8545	570	12067	804	29%	71%
A - met bomen onder de stoep	15	2262	151	9769	651	12031	802	19%	81%
A - met bomen onder de weg	15	2665	178	12374	825	15039	1003	18%	82%
A - straten met bomen	45	6405	142	22690	504	29095	647	22%	78%
A - zonder bomen onder de stoep	15	979	65	12502	833	13481	899	7%	93%
A - zonder bomen onder de weg	15	1293	86	11638	776	12931	862	10%	90%
A - straten zonder bomen	30	2033	68	19205	640	21238	708	10%	90%
Den Haag (H) totaal	116	12155	105	42498	366	54653	471	22%	78%
H - boomspiegel	24	4880	203	13649	569	18529	772	26%	74%
H - met bomen onder de stoep	24	4338	181	13371	557	17709	738	24%	76%
H - met bomen onder de weg	24	4114	171	15092	629	19206	800	21%	79%
H - straten met bomen	72	9428	131	29744	413	39172	544	24%	76%
H - zonder bomen onder de stoep	24	3591	150	17756	740	21347	889	17%	83%

H - zonder bomen onder de weg	24	3062	128	15748	656	18810	784	16%	84%
H - straten zonder bomen	48	5388	112	26097	544	31485	656	17%	83%
Dordrecht (D) totaal	90	10839	120	40168	446	51007	567	21%	79%
D - boomspiegel	18	3725	207	10659	592	14384	799	26%	74%
D - met bomen onder de stoep	18	4202	233	14896	828	19098	1061	22%	78%
D - met bomen onder de weg	18	3502	195	12910	717	16412	912	21%	79%
D - straten met bomen	54	8328	154	27314	506	35642	660	23%	77%
D - zonder bomen onder de stoep	18	2173	121	14548	808	16721	929	13%	87%
D - zonder bomen onder de weg	18	3125	174	15838	880	18963	1054	16%	84%
D - straten zonder bomen	36	4626	129	24106	670	28732	798	16%	84%
Leiden (L) totaal	60	6384	106	30516	509	36900	615	17%	83%
L - boomspiegel	12	2819	235	7784	649	10603	884	27%	73%
L - met bomen onder de stoep	12	2023	169	9713	809	11736	978	17%	83%
L - met bomen onder de weg	12	2245	187	9913	826	12158	1013	18%	82%
L - straten met bomen	36	5466	152	20576	572	26042	723	21%	79%
L - zonder bomen onder de stoep	12	713	59	7464	622	8177	681	9%	91%
L - zonder bomen onder de weg	12	859	72	12778	1065	13637	1136	6%	94%
Leiden straten zonder bomen	24	1394	58	16494	687	17888	745	8%	92%
Tilburg (T) totaal	122	10616	87	61268	502	71884	589	15%	85%
T - boomspiegel	26	3910	150	17990	692	21900	842	18%	82%
T - met bomen onder de stoep	24	3322	138	18481	770	21803	908	15%	85%
T - met bomen onder de weg	24	3794	158	21666	903	25460	1061	15%	85%
T - straten met bomen	74	8187	111	42344	572	50531	683	16%	84%
T - zonder bomen onder de stoep	24	2297	96	21901	913	24198	1008	9%	91%
T - zonder bomen onder de weg	24	2088	87	20948	873	23036	960	9%	91%
T - straten zonder bomen	48	3839	80	33864	706	37703	785	10%	90%