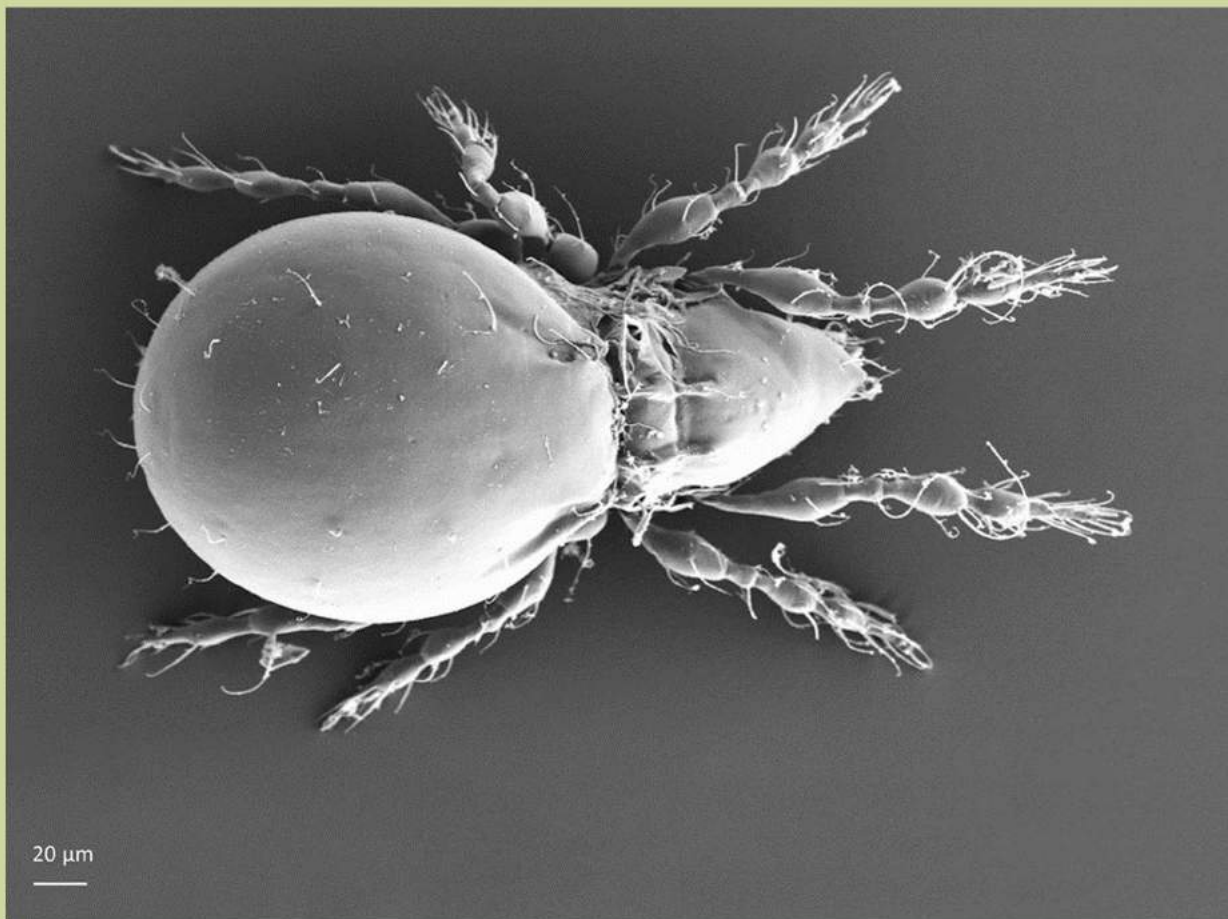




Kennisnetwerk OBN

Verbetering strooiselafbraak



Verbetering strooiselafbraak

OBN 2017-103-DZ

Jaap Bloem – Wageningen Environmental research
Leon van den Berg – Bosgroep Zuid Nederland
Evi Verbaarschot – Onderzoekcentrum B-WARE
Wim Dimmers – Wageningen Environmental research
Marcel Polling – Wageningen Environmental research
Arjen de Groot – Wageningen Environmental research
Ivo Laros – Wageningen Environmental research
Anjo de Jong – Wageningen Environmental research
Bart Nyssen – Bosgroep Zuid Nederland
Roland Bobbink – Onderzoekcentrum B-WARE
Maaïke Weijters – Onderzoekcentrum B-WARE



©2022 IPO, Vereniging het Interprovinciaal Overleg, BIJ12, uitvoeringsorganisatie van de gezamenlijke provincies, Utrecht.

Rapport nummer OBN-2017-103-DZ

Deze publicatie is tot stand gekomen met een financiële bijdrage van BIJ12 en het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en met financiële steun van de provincie Noord-Brabant.

Teksten mogen alleen worden overgenomen met bronvermelding.

Wijze van citeren: Bloem, J., van den Berg, L., Verbaarschot, E. e.a., 2022.

Verbetering strooiselafbraak. Rapport nummer OBN-2017-103-DZ, Kennisnetwerk OBN, Driebergen.

Deze uitgave is online gepubliceerd op www.natuurkennis.nl

Samenstelling	Jaap Bloem – Wageningen Environmental research Leon van den Berg – Bosgroep Zuid Nederland Evi Verbaarschot – Onderzoekcentrum B-WARE Wim Dimmers – Wageningen Environmental research Marcel Polling – Wageningen Environmental research Arjen de Groot – Wageningen Environmental research Ivo Laros – Wageningen Environmental research Anjo de Jong – Wageningen Environmental research Bart Nyssen – Bosgroep Zuid Nederland Roland Bobbink – Onderzoekcentrum B-WARE Maaïke Weijters – Onderzoekcentrum B-WARE
Foto voorkant	<i>Oppiella nova</i> , (fungivore grazer), Anna Seniczak, Bergen university, Norway
Productie	Vereniging van Bos- en Natuurterreineigenaren (VBNE) Adres: Princenhof Park 7, 3972 NG Driebergen Telefoon: 0343-745250 E-mail: info@vbne.nl

Voorwoord

Behoud maar zeker ook het herstel van biodiversiteit behoort tot de kerndoelen van de overheid. Om dit doel te realiseren ontwikkelt en verspreidt het Kennisnetwerk Ontwikkeling en Beheer Natuurkwaliteit (OBN) daarvoor toepasbare kennis over herstelmaatregelen voor Natura 2000, de aanpak van stikstof, de leefgebiedenbenadering, de ontwikkeling van nieuwe natuur én het cultuurlandschap.

Veel natuurgebieden op de droge zandgronden hebben te maken met vermesting en verzuring van de bodem. Dit wordt veroorzaakt door de neerslag van stikstof en zwavel uit de lucht. Het gevolg is dat de mineralenbalans van de ecosystemen op zandgrond verstoord is geraakt. Dit heeft weer negatieve effecten op schimmels, bacteriën en microgeleedpotigen, die een essentiële rol spelen bij de strooiselafbraak. Zonder een goede strooiselafbraak stopt het hele boscysteem.

Dit onderzoek richt zich op de vraag of het bodemleven profiteert van maatregelen die bodemverzuring tegengaan, zoals het toedienen van extra fosfor en steenmeel, of het toevoegen van bodemfauna met donorstrooisel. Uit de experimenten in het veld kwam naar voren dat het toedienen van steenmeel het bodemleven een flinke impuls geeft. Deze herstelmaatregel lijkt dus een waardevol middel om de negatieve effecten van vermesting en verzuring in de droge bossen te enigszins terug te draaien.

Ik wens u veel leesplezier,

Teo Wams
Voorzitter van de OBN Adviescommissie

Inhoud

Samenvatting	5
Summary	10
Dankwoord	13
1. Inleiding	14
1.1 Aanleiding	14
1.2 Doel en vraagstelling	15
1.3 Aanpak van het onderzoek	16
2. Methoden	17
2.1 Bepaling van de microarthropoden gemeenschap	17
2.2 Bodemchemie	19
3. Veldonderzoek	21
4. Experimenten	29
4.1 Aanpak	29
4.2 Bodemchemie	34
4.3 Microarthropoden	42
5. Discussie	57
6. Conclusies en aanbevelingen voor beheer	60
7. Literatuur	62
Bijlage 1. Veldonderzoek – data analyse chemie en microbiota	64
Bijlage 2. Schema proefveldjes	109
Bijlage 3. Experimenten – Beschikbaar Ca, Mg, K	111
Bijlage 4. Experimenten – PCA microarthropoden. Effecten locatie, bodemlaag en steenmeel.	113
Bijlage 5. Vergelijking microarthropoden van Otterlose bos strooisel met de Hoge Veluwe	119

Samenvatting

Aanleiding en vraagstelling

In het pleistocene zandlandschap is door atmosferische depositie van stikstof (N), en voorheen ook zwavel (S) verbindingen, zowel verzuring als vermessing van de bodem opgetreden. Door de verzuring (afname buffercapaciteit) zijn kationen zoals calcium (Ca), kalium (K) en magnesium (Mg) uitgespoeld, en is de beschikbaarheid van aluminium (Al) verhoogd. Bovendien wordt de afbraak van organisch materiaal en het vrijkomen van mineralen (mineralisatie) geremd. Door de overmaat aan stikstof is de mineralenbalans verstoord. Een groot deel van de loofbossen op droge voedselarme zandbodems – veelal met Zomereik – hebben te maken met deze problemen die doorwerken in de voedselketen, met verminderde boomgroei en sterfte tot gevolg.

Voor de strooiselafbraak en mineralisatie is de bodemfauna cruciaal. Hierin zijn waarschijnlijk verschuivingen opgetreden in soortensamenstelling en functionele groepen (voedselgilden).

Daarom is het van belang om te weten of en hoe dit bodemleven hersteld kan worden.

Stikstofdepositie heeft negatieve effecten op schimmels, die de voedselbron vormen voor belangrijke groepen microarthropoden. Deze kleine (circa 1 mm) maar talrijke microgeleedpotigen (tien- tot honderdduizend per vierkante meter) spelen een essentiële rol bij de strooiselafbraak.

Sommige soorten microarthropoden versnipperen strooisel en andere, de fungivoren, eten en verteren schimmelbiomassa. Ze stimuleren de afbraak en het vrijkomen van mineralen waardoor zowel micro-organismen als de vegetatie beter kunnen groeien.

Recente gunstige resultaten van het toevoegen van fosfor (P) en kalk (Ca) aan een verarmde heidebodem met een sterk herstel van de microarthropoden, roepen de vraag op of maatregelen voor het tegengaan van verzuring, herstel van buffercapaciteit en opheffing van beperkingen ook perspectief bieden voor herstel van de bossen op arme droge zandgrond.

Dit onderzoek beoogt antwoord te geven op de volgende vragen:

kan de microarthropoden gemeenschap worden bevorderd door

(1) toevoeging van extra P voor opheffing P-limitatie?

(2) toevoeging van bodemfauna met donorstrooisel voor opheffing van de dispersiebelemmering?

(3) toevoeging van steenmeel, waarmee meer sporenelementen en basische kationen beschikbaar komen?

Er werd aangesloten op bestaande kennis en lopend onderzoek met een combinatie van (1) veldonderzoek in loofbossen op droge zandbodems met verschillende voedselrijkdom en een bekende boshistorie en (2) systematische factoriële experimenten in bos met een hoog aandeel Zomereik op de Hoge Veluwe en in het Mastbos.

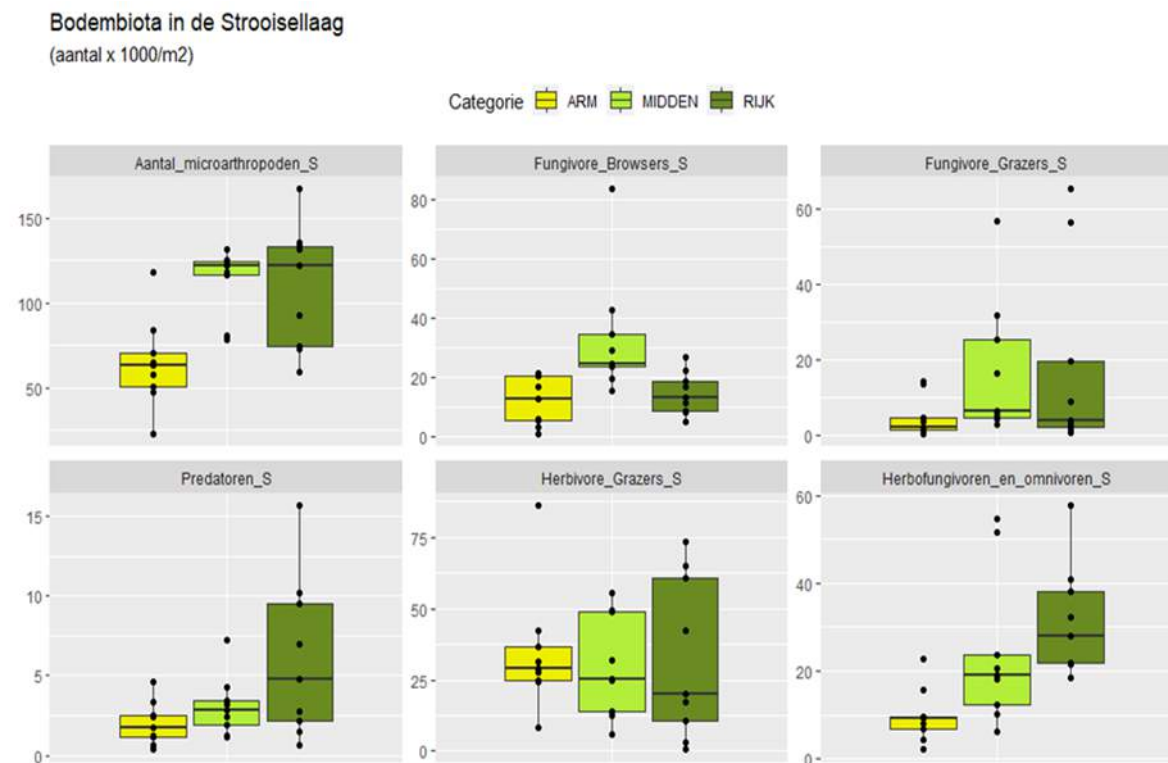
Veldonderzoek

In het veldonderzoek werd onderzocht wat de relatie is tussen de totale voorraad elementen in de bodem, basenverzadiging, pH (zuurgraad) en het voorkomen van verschillende groepen microarthropoden. Op basis van P-totaal, N-totaal en silt-fractie werden 9 locaties geselecteerd en ingedeeld in 3 klassen met elk 3 locaties. ARM is zandig met weinig P en N, MIDDEN is zandig met een matige leemfractie en geringe P en N, en RIJK is lemig met relatief hoge P en N concentraties. De veldstudie werd aangevuld met een Natura 2000 referentie locatie in Gelderland, het Otterlose bos. Dit is een meer natuurlijk oud bos, en daarom gebruikt als donorlocatie voor de toevoeging van strooisel (fauna) in het experiment op de Hoge Veluwe. Voor het experiment in het Mastbos is het Ulvenhoutse voorbos (N2000) gebruikt als donorlocatie.

Op deze 10 locaties zijn in mei 2019 de microarthropoden bemonsterd in de organische laag (strooisel) en de minerale bodem van 0 tot 10 cm diepte. De microarthropoden zijn geëxtraheerd, de aantallen microscopisch geteld en het DNA geanalyseerd. Daarna werden de resultaten verder uitgewerkt tot aantallen per m², taxonomische diversiteit (aantal taxa en Shannon index) en functionele diversiteit in termen van voedselgilden. Hierbij zijn de volgende groepen onderscheiden: fungivore browsers, fungivore grazers (voornamelijk mijten), herbivore browsers,

herbivore grazers, herbofungivoren+omnivoren en predatoren. Browsers (zuigers) eten de celinhoud, dit kan de schimmelactiviteit remmen. Grazers (kauwers) verteren ook celwanden, en zijn het meest effectief voor recycling van nutriënten en het stimuleren van de schimmelactiviteit. Herbivoren eten plantaardig materiaal, omnivoren gebruiken verschillende voedselbronnen en predatoren eten andere veelal kleinere beesten.

In de rijkere bodems waren de aantallen microarthropoden het grootst met meer dan 100.000 per m². Het overgrote deel zat in de strooisellaag. Met name omnivoren en predatoren namen toe met voedselrijkdom van de bodem.



Relaties tussen microarthropoden en bodemchemie werden onderzocht door middel van multivariate analyses en linear mixed effects models. In de rijkere boslocaties was de pH hoger, en positief gerelateerd aan de basenverzadiging (buffering). Locaties met een hogere buffering, hogere pH en minder oplosbaar aluminium hadden een dunner strooisellaag. Aluminium is giftig als het oplost in bodemvocht. Een dunner strooisellaag wijst op een betere strooiselafbraak. Basische kationen (de som van Mg, Ca en K) waren positief gecorreleerd met fungivore browsers en predatoren in de strooisellaag. De dikte van de strooisellaag was negatief gerelateerd aan het aantal fungivore browsers en het totaal aantal microarthropoden. Om oorzakelijke verbanden en beheersopties voor verbetering van de strooiselafbraak te onderzoeken, zijn factoriële veldexperimenten uitgevoerd.

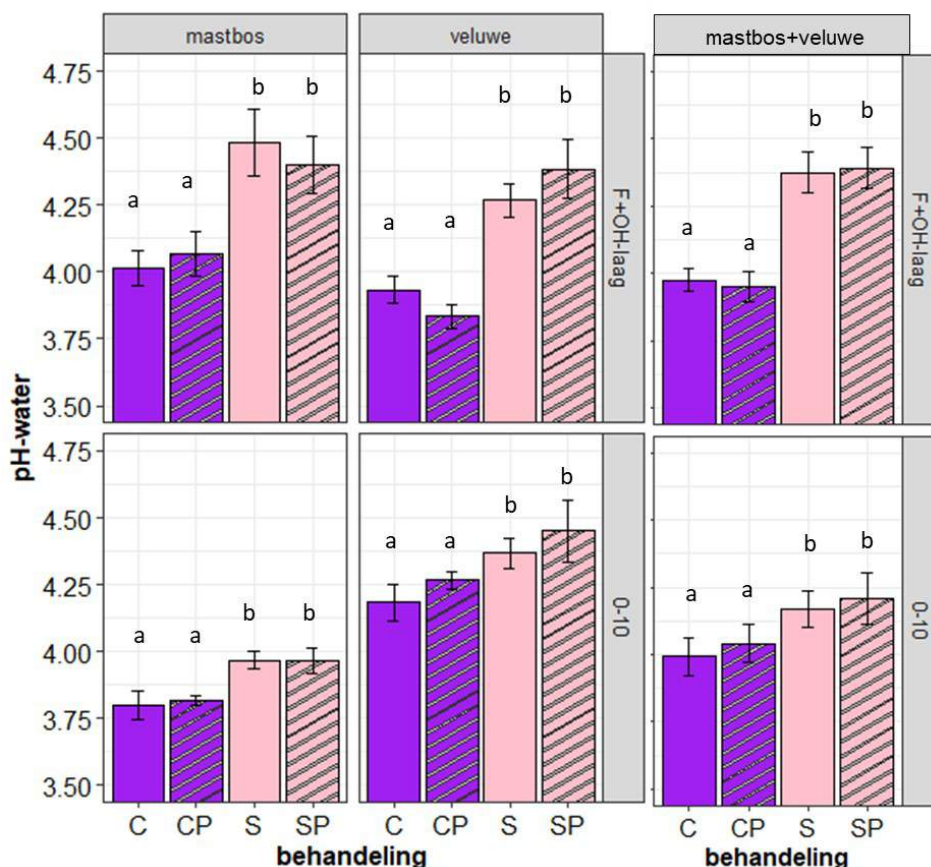
Experimenten

In de experimenten werd onderzocht of mogelijke beperkingen voor microarthropoden in de bodem kunnen worden opgeheven door toediening van

- Steenmeel (2016, 10 ton soilfeed/ha), voor opheffing van mineralenonbalans en verbetering van de buffercapaciteit tegen verzuring.
- P (fosfor 2019, 50 kg/ha), voor opheffing van P beperking.
- F (Fauna 2019) met strooisel van een referentie locatie (Natura 2000), voor opheffing van dispersie beperking die kan leiden tot het ontbreken van soorten en/of groepen.

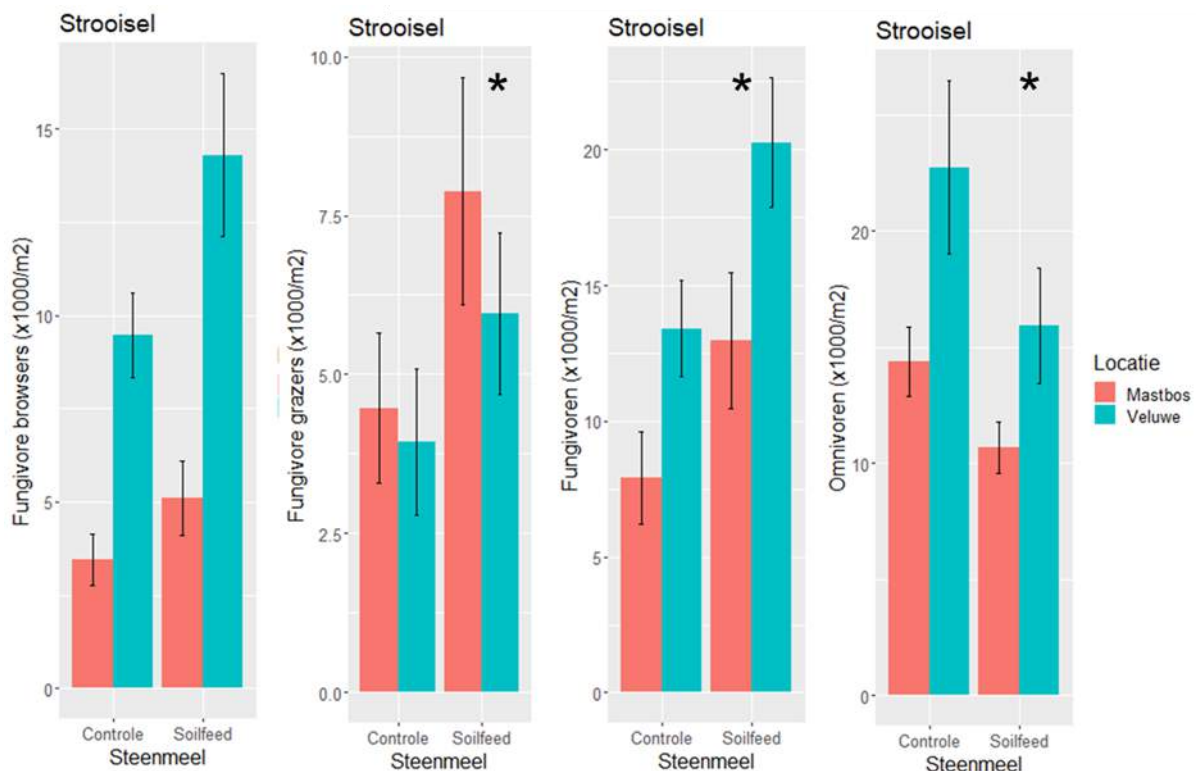
Omdat veranderingen in de bodem langzaam gaan, en effecten van steenmeel naar verwachting pas na 3 tot 5 jaar meetbaar zouden worden, werden de experimentele behandelingen ingezet binnen lopende steenmeelproeven in het Mastbos en op de Hoge Veluwe. Hiermee werd een tijdswinst van drie effectjaren geboekt omdat de steenmeelbehandelingen al in maart 2016 werden toegediend. De steenmeel experimenten, met een ("*randomized block design*") van 3 proefvlakken werden in februari 2019 uitgebreid met *split plots* binnen de bestaande proefvlakken. Vervolgens werden jaarlijks bodemchemische analyses uitgevoerd. Ruim twee jaar na de toevoegingen van P en Fauna werden in eind mei 2021 de microarthropoden geanalyseerd in het strooisel (organische laag) en de minerale bodem (0-10 cm).

Toediening van steenmeel verbeterde de bodembuffering. De basenverzadiging was verhoogd in de winter van 2019-2020, maar op de Veluwe verlaagd in de zomer van 2021, en in de winter van 2021-2022 waren er geen verschillen. Toediening van P leidde tot hogere concentraties in de winter van 2019-2020. In de zomer van 2021 was P nog verhoogd in de minerale bodem, maar lager in de organische strooisellaag. In combinatie met steenmeel was het P gehalte lager in de organische laag. De seizoensvariaties met lagere zomerwaarden in de strooisellaag zijn mogelijk een gevolg van biologische omzettingen. De steenmeelbehandeling (S) verhoogde de pH met 0.4 eenheden in de strooisel-(F+OH)laag en met 0.2 eenheden in de minerale bodem, ten opzichte van de controle (C) zonder steenmeel.



De totale aantallen microarthropoden lagen rond de 30.000 per m² in het Mastbos en 45.000 per m² op de Veluwe. De soortensamenstelling verschilde tussen de beide locaties. De toediening van steenmeel, P en/of fauna had geen effect op de totale aantallen en diversiteit van de microarthropoden.

Steenmeel had wel effect op de soortensamenstelling en de voedselgilden. In de strooisellaag waren er de helft meer fungivoren met steenmeel.



Deze toename in aantallen was het meest significant voor de fungivore grazers. De fungivore browsers waren het sterkst verhoogd met steenmeel op de Veluwe. In de minerale bodemlaag waren de verschillen in aantallen fungivoren niet significant. De verhoogde aantallen fungivoren in de strooisellaag leidden niet tot hogere aantallen van de totale microarthropoden gemeenschap omdat de hoeveelheden omnivoren juist lager waren na toediening van steenmeel.

Steenmeel verhoogde de pH-water met 0,4 eenheden, van gemiddeld 4,1 naar 4,5 in het Mastbos, en van 3,9 naar 4,3 op de Veluwe. Het aantal fungivore grazers in de strooisellaag correleerde positief met de pH ($R = 0.63$, $P \leq 0.001$), met een sterke toename bij pH waarden groter dan 4.3. Onder de pH 4.5 wordt de schimmelgroei sterk geremd, wat kan leiden tot minder voedsel voor de fungivoren.

Conclusies en aanbevelingen

Het onderzoek beoogt antwoord te geven op de volgende vragen:

kan de microarthropoden gemeenschap worden bevorderd door

- (1) toevoeging van extra P voor opheffing P-limitatie?
- (2) toevoeging van bodemfauna met donorstrooisel voor opheffing van de dispersiebelemmering?
- (3) toevoeging van steenmeel, waarmee meer sporenelementen en basische kationen beschikbaar komen?

P-limitatie

Uit dit onderzoek kwam duidelijk naar voren dat veranderingen in de P-beschikbaarheid geen effect hadden op de aantallen microarthropoden en de hoeveelheden van de verschillende voedselgilden. Voor het beheer betekent dit dat er op dit moment geen aanwijzingen zijn dat het toedienen van fosfor effectief is voor het stimuleren van de strooiselafbraak. Daarnaast geven deze resultaten een indicatie dat het toedienen van bufferstoffen in eikenbos, waarbij de P-beschikbaarheid in de bodem lijkt af te nemen, binnen deze onderzoekstermijn niet direct schadelijk is voor de microarthropoden gemeenschap. Kanttekening hierbij is dat het mogelijk is dat de P-limitatie niet

werd opgeheven met deze P-gift door een lage oplosbaarheid, of dat de microarthropoden gemeenschap in alle onderzochte terreinen slecht ontwikkeld was. Om een beter inzicht te verkrijgen is het daarom van belang dat er een goed referentiebeeld wordt gevormd van de samenstelling van de microarthropoden gemeenschap en bodemchemie van goed functionerende eikenbossen op zandgronden.

Enten van de bodemfauna

Uit deze studie kwamen geen aanwijzingen dat het toevoegen van strooisel uit een meer natuurlijk oud eikenbos (enten) effect had op de totale aantallen microarthropoden en de aantallen van de voedselgilden zoals de fungivoren. Voor beheer betekent dit dat het op dit moment niet kansrijk wordt geacht om de strooiselafbraak te stimuleren door het enten met bodemfauna op een intacte bodem met een bestaande strooisellaag.

Verbeteren van de bodembuffering met steenmeel

Steenmeel verhoogde de pH en de basenverzadiging, het meeste in de strooisellaag waarbij de aantallen fungivoren 50% hoger waren. Dit is een aanzienlijk effect en lijkt veelbelovend voor een verhoogde activiteit van schimmels en mogelijk ook bacteriën. Dit kan leiden tot snellere strooiselafbraak en uiteindelijk een hogere beschikbaarheid van nutriënten voor de planten. Uit de experimenten in Mastbos en Veluwe bleek dat de hoeveelheid fungivore grazers in het strooisel duidelijk toenam vanaf een pH van 4,3. Toch werden er geen hogere totale aantallen microarthropoden gevonden, omdat de toename van de fungivoren gepaard ging met een afname van het aantal omnivoren.

Voor beheer betekenen deze resultaten dat het verhogen van de bodem pH in situaties waarbij de pH-water lager is dan 4,3, waarschijnlijk positieve effecten heeft op het bodemleven. Dit pleit voor meer onderzoek naar combinatie-toepassingen waarbij wordt getracht de bodem pH nog wat verder te verhogen dan nu met deze steenmeeltoepassingen wordt gedaan. Er is grote behoefte aan meer inzicht in drempelwaarden, zowel aan de onderkant (remming van het bodemleven) als aan de bovenkant (overdosering waarbij negatieve effecten optreden), en aan langere-termijn onderzoeken naar steenmeel en/of bekalking in de bossen. Het op (kleine schaal) toepassen van bufferherstelmaatregelen waarbij de effecten op bodemchemie en bodemleven goed worden gevolgd, lijkt daarbij een waardevol middel om meer inzicht te verkrijgen.

Summary

Introduction

In the Pleistocene sand landscape in the Netherlands both soil acidification and eutrophication have occurred due to atmospheric deposition of nitrogen (N) and, previously, sulphur (S) compounds. This has led to a strong decrease in the characteristic nutrient-poor and (very) lightly buffered habitat types of the dry sand landscape. The progressive soil acidification (= decrease in buffer capacity) implies that cations such as calcium (Ca), potassium (K) and magnesium (Mg) are being flushed out, and the availability of aluminum (Al) has been increased. In addition, the decomposition of organic matter and the release of minerals is inhibited. The excess of nitrogen has disturbed the mineral balance of the vegetation systems on sandy soils. The majority of the dry, poor deciduous forests, usually oak stands, are affected. Problems are cascading through the food chain, resulting in reduced tree growth and mortality.

Soil fauna is key to litter decomposition and mineralization. Probably shifts have occurred in the composition of species and feeding guilds. Therefore it is important to know if and how the soil biota can be restored. Nitrogen deposition negatively affects fungi, which are the main food source for important groups of microarthropods. These tiny (c. 1 mm) but abundant organisms (10.000-100.000 per meter square) play an essential role in litter decomposition. Some species are shredders of organic matter and others, the fungivores, consume and digest fungal biomass. They accelerate the decomposition and release of mineral nutrients which promotes the growth of micro-organisms as well as the plants.

Recent favorable results of amendment of an impoverished heathland soil with phosphorus (P) and lime (Ca) and a strong recovery of microarthropods, raised the question whether soil management aimed at countering acidification, recovering buffer capacity and lifting possible limitations has potential also for recovery of forests on poor dry sandy soils.

This project aims to answer the following questions:

can the microarthropod community be enhanced by

- (1) addition of extra P to lift P-limitation?
- (2) addition of soil fauna with donor litter to lift dispersion limitation?
- (3) addition of rock powder, to increase availability of base cations and trace elements.

The project was connected to existing knowledge and ongoing research with a combination of (1) field research in deciduous forests on dry sandy soils with different nutrient richness and a known forest history and (2) systematic factorial experiments in two forests with a high proportion of oak, in National Park *de Hoge Veluwe* and the *Mastbos* forest.

Field study

In the field study relationships between soil chemistry, base saturation, pH and abundances of different groups of microarthropods were investigated. Based on P-total, N-total and silt fraction, 9 sites were selected and divided into 3 classes with 3 sites each. POOR is sandy with little P and N, MEDIUM is sandy with a moderate loam fraction and low P and N, and RICH is loamy with relatively high P and N contents. In addition a Natura 2000 reference forest site in the province of Gelderland, the Otterlose Bos was sampled. This is a more natural old forest, and therefore was used as a donor location for the addition of litter (fauna) to the Hoge Veluwe experiment. For the Mastbos experiment in the province of Noord-Brabant, a nearby Natura 2000 forest at Ulvenhout was used as a donor location.

At these 10 locations, in May 2019 microarthropods were sampled in both the organic layer (litter) and the mineral soil at 0-10 cm depth. Microarthropods were extracted, numbers counted by microscopy and DNA analyzed. The data were processed to numbers per m², taxonomic diversity (number of taxa and Shannon index) and functional diversity in terms of feeding guilds. The following groups were distinguished: fungivorous browsers, fungivorous grazers (mainly mites),

herbivorous browsers, herbivorous grazers, herbofungivores+omnivores and predators. Browsers feed on cell contents only, and may inhibit fungal activity. Grazers also digest cell walls, and are therefore more effective for recycling nutrients and stimulating fungal activity. Herbivores consume plant material, omnivores use different food sources and predators eat other usually smaller animals. In the richer soils, microarthropod densities were highest with over 100,000 per m². The vast majority was found in the litter layer. In particular omnivores and predators increased with the nutrient richness of the soil.

Relationships between microarthropods and soil chemistry were investigated using multivariate analyses and linear mixed effects models. In the richer forest locations, pH was higher and positively related to base saturation (buffering). Sites with higher buffering capacity, higher pH and less soluble aluminum had a thinner litter layer. Aluminum is toxic when dissolved in soil moisture. A thinner litter layer suggests faster litter decomposition. Base cations (the sum of Mg, Ca and K) positively correlated with fungivorous browsers and predators in the litter layer. Litter thickness was negatively related to the number of fungivorous browsers and the total number of microarthropods. Factorial field experiments were performed to investigate causal relationships and management options for improving litter decomposition.

Experiments

In the experiments it was investigated whether potential limitations on microarthropods in the soil can be overcome by application of

- Rock powder (2016, 10 tons of soilfeed/ha), for reducing mineral imbalances and improving the buffer capacity against acidification.
- P (phosphorus 2019, 50 kg/ha), for lifting P limitation.
- F (Fauna 2019) with litter from a reference location (Natura 2000), for lifting dispersion limitations leading to absence of species and/or groups.

Because changes in soil are slow and significant effects of rock powder were not expected within 3 years, the treatments were implemented within ongoing rock powder trials at Mastbos and Hoge Veluwe. This saved 3 years since the rock powder had already been applied in March 2016. The rock powder experiments, with a randomized block design and 3 replicates per treatment, were extended in February 2019 with split plots within the existing treatments. Subsequently, soil chemical analyses were performed annually. More than two years after the additions of P and Fauna, the microarthropods were analyzed in both the litter (organic layer) and the mineral soil (0-10 cm) in late May 2021.

The rock powder application improved soil buffering capacity. The base saturation increased in the winter of 2019-2020, but in the Veluwe it decreased in the summer of 2021, and there were no differences in the winter of 2021-2022. The P application resulted in higher concentrations in winter 2019-2020. In the summer of 2021, P was still elevated in the mineral soil, but lower in the organic litter layer. Combined with rock powder, the P content was lower in the organic layer. The seasonal variations with lower summer values in the litter layer may be a result of biological activity. The rock powder treatment increased the pH by 0.4 units in the litter (F+OH) layer and by 0.2 units in the mineral soil, compared to the control without rock powder.

The total numbers of microarthropods were around 30,000 per m² in the Mastbos and 45,000 per m² in the Veluwe. Species composition differed between the two locations. The application of rock powder, P and/or fauna did not affect the total number and diversity of the microarthropods. Rock powder, however, did affect the species composition and abundances of feeding guilds. In the litter layer, fungivores had increased by 50% with rock powder. The increase was most significant for the fungivorous grazers. The fungivorous browsers had increased with rock dust especially in the Veluwe. In the mineral soil layer the differences in numbers of fungivores were not significant. The increased numbers of fungivores in the litter layer did not result in higher total microarthropod numbers, because the omnivores were reduced after rock powder application. This treatment had increased the pH(-water) by 0.4 units, from on average 4.1 to 4.5 in the Mastbos, and from 3.9 to

4.3 in the Veluwe litter. The number of fungivorous grazers in the litter layer correlated positively with pH ($R = 0.63$, $P \leq 0.001$), with a strong increase at pH values greater than 4.3. Below pH 4.5 fungal growth is strongly inhibited, which may reduce the availability of food for the fungivores.

Conclusions and management recommendations

This project aims to answer the following questions:

can the microarthropod community be enhanced by

(1) addition of extra P to lift P-limitation?

(2) addition of soil fauna with donor litter to lift dispersion limitation?

(3) addition of rock powder, to increase availability of base cations and trace elements.

P-limitation

Changes in P availability had no effect on the numbers of microarthropods and abundances of the different feeding guilds. For management, this means that there are currently no indications that phosphorus application is effective for enhancement of litter decomposition. In addition, the results indicate that application of buffering elements in oak forest soils, apparently resulting in reduced P-availability, was not harmful to the microarthropod community within the research period. It should be noted that possibly P-limitation was not eliminated with extra P addition due to low solubility, or that the microarthropod community in all investigated locations may have been poorly developed. For better insight, it is therefore important that sufficient reference data are collected of soil biota and soil chemistry of well-functioning oak forests on sandy soils.

Addition of soil fauna

There was no indication from this study that adding litter from a more natural old oak forest (inoculation) had an effect on the total numbers of microarthropods and abundances of feeding guilds such as the fungivores. For management, this means that it appears currently not promising to enhance litter decomposition by addition of soil fauna to intact soil profiles with an existing litter layer.

Enhancing soil buffering capacity with rock powder

Rock powder increased pH and base saturation in the litter layer while numbers of fungivorous microarthropods were 50% higher. This is a significant effect and promising for increasing activity of fungi and possibly bacteria which may result in enhanced litter decomposition and nutrient availability for plant growth. The experiments in Mastbos and Veluwe showed that the abundance of fungivorous grazers in the litter layer clearly increased with pH above 4.3. However, total numbers of microarthropods were not increased, because the increase in fungivores was accompanied by a decrease in omnivores.

For management, the results imply that increasing soil pH where it is below 4.3, is probably beneficial to soil biota. More research is required on combined applications to raise soil pH further than with the current rock powder applications. There is a need for more insight into threshold values, both at low (inhibition of soil biota) and at high levels (overdose with negative effects), particularly in longer-term studies on rock powder and/or liming application in forests. Applying recovery measures on a small scale with close monitoring of effects on soil chemistry and biota seems to be a valuable way forward to gain more insight.

Dankwoord

De auteurs bedanken Bij12, het ministerie van Economische Zaken en de provincie Noord-Brabant voor de financiering van dit onderzoek; Staatsbosbeheer en de Stichting het Nationaal Park de Hoge Veluwe en de beheerders Karin van Hoof en Leontien Krul voor het beschikbaar stellen van het terrein en de medewerking voor de experimenten in het Mastbos en op de Hoge Veluwe , en het OBN Deskundigen Team Droog Zandlandschap voor de begeleiding bij de aanvang en afronding van het onderzoek.

1. Inleiding

1.1 Aanleiding

In het pleistocene zandlandschap is door atmosferische depositie van stikstof (N) en, voorheen, zwavel (S) verbindingen zowel bodemverzuring als vermesting opgetreden. Dit heeft geleid tot een sterke kwalitatieve afname van de kenmerkende voedselarme en (zeer) licht gebufferde habitattypen van het droog zandlandschap. Door de voortschrijdende bodemverzuring (= afname buffercapaciteit) zijn kationen zoals calcium (Ca), kalium (K) en magnesium (Mg) steeds meer uitgespoeld, en is de beschikbaarheid van aluminium (Al) verhoogd. Verder wordt de afbraak van organisch materiaal en vaak ook de nitrificatie geremd. Daarnaast is door de overmaat aan stikstof de mineralenbalans van de systemen op zandgronden verstoord geraakt. In de bovengrond van bossen is ammonium nu de dominante N-vorm voor planten, met name doordat gereduceerd N (ammoniak/ammonium) al decennia lang meer dan 75% van de atmosferische N-depositie uitmaakt, vaak in combinatie met een geremde nitrificatie.

Aan deze problematiek is de laatste jaren veel aandacht besteed in verband met het herstel van de kenmerkende biodiversiteit in heiden en heischrale graslanden. Echter, ook de loofbossen op voedselarme of soms iets rijkere zandbodems – veelal met Zomereik – hebben te maken met deze problemen. Uit vroeger en recent onderzoek is naar voren gekomen dat in eikenbossen op arme zandgronden sprake is van een mineralenonbalans die doorwerkt in de voedselketen (Bobbink et al., 2012; Van der Burg et al., 2014). Sterke gevoeligheid voor verminderde groei en zelfs sterfte van Zomereik in perioden van droogte, en veel insectenvraat op plaatsen met een mineralenonbalans zijn recent ook zichtbaar geworden op veel plaatsen (Oosterbaan, 2014, Lucassen et al., 2014 a,b, van den Burg et al., 2014). In een vergelijkingsstudie van 10 bosgebieden in Nederland, met daarbinnen opstanden met zowel hoge als lage sterfte vonden Oosterbaan et al. (2014) niet alleen lage Mg en K gehalten, maar ook zeer lage mangaan (Mn) gehalten in de bodems van de plekken met veel sterfte. Dit onderzoek onderstreept daarmee het belang van zowel macro- als micronutriënten bij bossterfte. Daarmee is dat onderzoek ook een belangrijk aangrijpingspunt voor het ontwikkelen van effectieve maatregelen.

Veel bosgebieden zijn vanwege de actuele en potentiële natuurwaarde onderdeel van het Natura 2000 netwerk en vormen een cruciaal onderdeel van een vitaal natuurnetwerk. Met name in bossen met loofhoutsoorten komen veel verschillende soorten voor, terwijl de bossen zelf naast een ecologische ook een grote recreatieve (beleving), milieu (fijn stof, CO₂ vastlegging) en economische (houtoogst, recreatie) functie hebben. Het probleem speelt in een groot deel van het Nederlandse bos op zandgrond. De urgentie wordt niet alleen om ecologische, economische of natuurbeschermingsredenen gevoeld: ook de veiligheid van recreanten komt in toenemende mate in het gedrang vanwege het risico van vallend dood hout (waardoor de beheerder extra kosten moet maken voor boomonderhoud).

Kant en klare effectieve herstelmaatregelen zijn er voor droge arme loofbossen op dit moment niet, terwijl het gezien de omvang van het areaal wel van groot belang is dat hier onderzoek naar gedaan wordt. In het verleden zijn er al wel experimenten geweest met bemesting en/of bekalking maar de daardoor ontstane verruiging is –bij de gebruikte hoge dosis -na een groot aantal jaren nog steeds merkbaar (herhalingsonderzoek Van Dobben, 2011) en vanuit natuuroogpunt ongewenst. Er bestaan echter nog duidelijke kennislacunes waar het gaat om de mogelijk positieve effecten en geringe bijwerkingen van lage doses bekalking en slow release mineralengiften. Naast het doel om de vitaliteit van bossen, in het bijzonder Zomereiken, te verbeteren, hebben de maatregelen ook tot doel de diversiteit van dieren te herstellen en het functioneren van de bosbodem te bevorderen.

Omdat de bodemfauna een cruciale rol speelt in het ecologisch functioneren van bosesystemen op de droge zandgronden via decompositieprocessen, en er door verzuring en ammoniakdepositie hierin allerlei verschuivingen zijn opgetreden, is het cruciaal om te weten hoe dit bodemleven hersteld kan worden. Gezien de recente positieve resultaten van het toevoegen van P aan een verarmde heidebodem (Vogels et al. 2016) en de sterke herstelreactie hierop van de bodemfauna (microarthropoden, ofwel micro geleedpotigen) (Siepel et al. 2018), zal het onderzoek zich ook met name richten op het meten van de P-beschikbaarheid in de verschillende bodemlagen (strooisel, waaruit voedingstoffen uit de decompositie worden betrokken, versus diepere bodem van waaruit hogere planten hun P kunnen betrekken uit verweringsproducten).

1.2 Doel en vraagstelling

Doel van het onderzoek is in de eerste plaats het vaststellen van de relatie tussen lagere C:N en hogere N:P ratio's in het gevallen blad (als gevolg van N depositie enerzijds en P uitspoeling anderzijds) op de strooiselomzetting en daarmee het (weer) beschikbaar komen van nutriënten voor boomgroei. Dit gebeurt in de context van de verzuring van veel van de Nederlandse bossen en een (mogelijk) gedegradeerde samenstelling van de bodemfauna.

In de tweede plaats wordt onderzocht of stimulering van het bodemleven mitigerend kan werken voor de nu aangetaste voedselkwaliteit van bovengrondse fauna als gevolg van verzuring en vermisting. Stimulering zou kunnen worden gerealiseerd door toevoeging van P als de bodemfauna compleet is, of door enten als veel soorten en/of belangrijke functionele groepen blijken te ontbreken.

Het onderzoek sluit nauw aan op de lopende experimenten met steenmeel in het Mastbos en de Hoge Veluwe (OBN 2015-73-DZ) waar in het najaar van 2018 aanvullende metingen werden gedaan aan bodemchemie en bodemleven in additionele projecten gefinancierd door de provincies Noord-Brabant en Gelderland. Hierbij werden effecten op (mycorrhiza)schimmels, bacteriën, microarthropoden, wormen en stikstofmineralisatie onderzocht na een looptijd van drie groeiseizoenen. Omdat veranderingen in de bodem in het algemeen, en verwerking van steenmeel in het bijzonder, langzame processen zijn, worden effecten naar verwachting pas na 3-5 jaar meetbaar. Daarom is het van cruciaal belang om lange termijn experimenten in stand te houden.

Hoewel we ons bewust zijn van het belang van meerdere functionele groepen van bodemleven (Kemmers et al., 2011, 2013; Kemmers, 2011, 2012; Kooijman et al., 2014), richten we ons in dit onderzoek met name op de hoeveelheden en biodiversiteit van microarthropoden (Acari en Collembola, ofwel mijten en springstaarten), zowel met klassieke microscopische tellingen zoals uitgevoerd voor het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit als met moderne DNA-technieken.

Het onderzoek beoogt antwoord te geven op de volgende vragen:

“Wat gebeurt er met de efficiëntie van de strooiselafbraak als extra N zorgt voor een verlaging van de C:N ratio (verwachting positief) en tot een verhoging van de N:P ratio (verwachting negatief), beide tegen een achtergrond van verzuring en doorgaande uitspoeling van (sporen)elementen (beide negatief voor de opstand)?” Complicerende factor is hierbij de geringe dispersie van grote delen van de bodemfauna, waardoor de leeftijd van de bodem een grote rol lijkt te spelen en dus onderscheiden moet worden van boven beschreven verandering in strooiselkwaliteit.

Anders geformuleerd,

Wordt de voedingstoestand van de opstand verbeterd door een meer efficiënte decompositie via:

- (1) toevoeging van extra P (opheffing P-limitatie bodemfauna en dus betere afbraak);
- (2) opheffen van de dispersiebelemmering van de bodemfauna (grotere diversiteit zorgt voor meer efficiëntie);
- (3) toevoegen van steenmeel, waarmee meer sporenelementen en basische kationen beschikbaar komen en de afbraakefficiëntie zelf minder belangrijk wordt?

Deze vragen werden onderzocht in loofbosgebieden op droge zandbodems met verschillende voedselrijkdom en met een bekende boshistorie. Gezien de problematiek en aansluiting op bestaande kennis, werd het onderzoek uitgevoerd in bos met een hoog aandeel Zomereik, met een combinatie van (1) veldonderzoek in bosgebieden op droge zandbodems met verschillende voedselrijkdom en een bekende boshistorie en (2) systematische factoriële experimenten in bos met een hoog aandeel Zomereik, gepaard met aanvullend literatuuronderzoek.

1.3 Aanpak van het onderzoek

Door veldonderzoek in uiteenlopende bosgebieden werd onderzocht wat de relatie is tussen de totale voorraad elementen in de bodem en de abundantie en diversiteit van microarthropoden. We hebben ons gericht op bossen die gedomineerd worden door Zomereik, zodat de resultaten van de correlatieve studie met die van de experimenten vergeleken kunnen worden. Lopend onderzoek (Correlatieve studie strooiseleffecten, subsidieprogramma biodiversiteit en leefgebieden provincie Noord-Brabant, van den Berg et al., 2018; Desie et al. 2020; BGZN et al., 2021) liet een sterk effect zien van boomsoort en strooiselkwaliteit, met veel minder mijten en meer regenwormen bij beter afbreekbaar strooisel. Dit hangt mogelijk samen met een minder schimmel-gedomineerd systeem. Daarom hebben we gekozen om boomsoort niet als extra factor mee te nemen, ook omdat er maar 10 locaties konden worden onderzocht voor het correlatieve veldonderzoek. Bovendien werden ook de factoriële veldexperimenten uitgevoerd in lopende proeven met Zomereik.

De experimenten in de bossen zijn "full-factorial" opgezet om effecten van de drie verschillende factoren en hun interacties te testen:

- (1) toevoeging van extra P
- (2) toevoeging van extra bodemfauna
- (3) toevoegen van sporenelementen in de vorm van steenmeel

De hypothese is dat een tekort aan één of meerdere van deze factoren de strooiselafbraak en daarmee de kringloop van elementen belemmert, en dat deze beperking van de afbraakefficiëntie kan worden opgeheven (verbeterd) door toevoeging van de ontbrekende factor(en).

2. Methoden

2.1 Bepaling van de microarthropoden gemeenschap

Monsterverzameling

Op elke locatie werden drie veldjes van 4x4 meter bemonsterd. In elk veldje werden 6 bodemonsters voor mijten en springstaarten gestoken met een deelbare boor van 5,8 cm in diameter. In de boor werden PVC-ringen (2,5 cm hoog) geplaatst. Deze houden het monster tijdens transport bijeen, en laten het in het lab gemakkelijk opdelen in strooisel- en bodemlaag.

Extractie van microarthropoden

Uit elk deelmonster werd apart een extractie van de microarthropoden uitgevoerd via een Tullgren-extractiemethode waarbij de bodem van bovenaf wordt verwarmd, zodat de fauna naar onderen wordt gedreven en uit het monster valt, waar het werd opgevangen in een steriele verzamelbuis met 96% ethanol. Deze extractie duurt meerdere dagen, waarbij dagelijks de verzamelbuis wordt vervangen, om te voorkomen dat teveel ethanol verdampt. Dit garandeert een optimaal behoud van de DNA-kwaliteit. Na afloop werden alle verzamelbuizen van de 6 replicate deelmonsters per monster locatie samengevoegd tot 1 batch microarthropoden voor verdere analyse van de abundantie en samenstelling.

Bepaling totale abundantie

Voorafgaand aan DNA-analyse (zie onder) werd onder de binoculair een telling uitgevoerd van de aantallen mijten en springstaarten. Hiermee werden de resultaten van de DNA-analyse, die inzicht geeft in de taxon diversiteit en relatieve verhoudingen tussen taxa, omgerekend naar absolute abundanties per taxon.

Bepaling taxonomische diversiteit via DNA metabarcoding

Elk monster, bestaande uit een collectie microarthropoden in ethanol, werd vervolgens overgebracht naar een steriele eppendorf buis, waarin het volledige monster werd gehomogeniseerd en een extractie van alle DNA in dit monster werd uitgevoerd. Vervolgens werd via next-generation sequencing (NGS) de exacte code bepaald van alle varianten in het monster van een bepaald DNA-fragment (de DNA barcode of DNA merker) waarvan bekend is dat de code verschilt tussen taxa. Voor microarthropoden wordt hiervoor gebruik gemaakt van gedeelte van het cytochrome c oxidase subunit I (CO1). Vervolgens werd elk van de verkregen codes vergeleken met een referentiedatabase van codes van taxa die mogelijk in het monster zouden kunnen voorkomen, op basis waarvan per DNA-variant een taxonomische identificatie kon worden uitgevoerd. Resultaat is een lijst met aangetroffen taxa per monster, en een inschatting van de relatieve abundanties van de verschillende taxa binnen een monster.

Functionele diversiteit

De verkregen informatie over taxonomische diversiteit per monster werd vervolgens omgezet in een overzicht van de functionele diversiteit in termen van voedselgilden (Siepel & de Ruiter-Dijkman 1993). Dit geeft een beeld van de rol van de aangetroffen organismen in het bodemvoedselweb en hun te verwachten bijdrage aan de strooisel-decompositie. Hiertoe beschikt WENR over een sleutel die elk taxon toewijst aan een bepaald voedselgilde, waarbij de volgende gilden worden onderscheiden: fungivoren (grazers en browsers), herbofungivoren (grazers en opportunisten), herbivoren (grazers en browsers), algemene predatoren, arthropode-predatoren, nematode-predatoren, omnivoren en parasieten. Bij de analyse van de absolute aantallen werden de herbofungivore grazers, en opportunistische herbofungivoren vanwege lage relatieve abundanties bij de omnivoren gevoegd. Het betreft hier dezelfde benadering als voor de Bodembioologische Indicator (Bobi) in het Landelijk Meetnet Bodemkwaliteit (Rutgers et al., 2007, 2009), wat een vergelijking mogelijk maakt met deze historische datasets.

Risico inschatting voor identificatie van taxa en voedselgildes via DNA

Bij de springstaarten (Collembola) zijn er geen probleemfamilies. DNA metabarcoding voor mijten (Acari) resulteert in de meeste gevallen tot determinatie op soortsniveau of genusniveau. In sommige gevallen moet worden teruggevallen op een hoger niveau (meestal familie), wegens ofwel onvoldoende verschillen in het DNA of het ontbreken van referentiedata. Ook bij conventionele determinatie via de microscoop is dit regelmatig het geval, maar dan wegens het ontbreken van discriminerende kenmerken bij bijvoorbeeld juveniele individuen. Op basis van de WENR-sleutel voor toewijzing voor voedselgildes weten we dat voor een betrouwbare toewijzing van voedselgildes in bosbodems een identificatie tot op familieniveau vrijwel altijd nog afdoende is, omdat slechts binnen een klein aantal van de daar aanwezige families variatie in gilde voorkomt. Om vooraf een onderbouwde schatting te maken van het risico op onvoldoende vermogen tot indeling in voedselgildes, hebben we ons gebaseerd op een totaaloverzicht van mijten-taxa die sinds 2000 in WENR-inventarisaties van bosccosystemen zijn waargenomen (o.a. BoBi). Voor alle 74 families in deze lijst zijn we nagegaan of 1) referentie-barcodes beschikbaar zijn voor identificatie tot op tenminste familieniveau en 2) in hoeverre meerdere voedselgildes voorkomen binnen de familie.

Voor 65 van de 74 families zijn referentiedata beschikbaar, voor negen families was dit niet het geval (tabel 2.1.1). Daarnaast zijn er zes families waarbinnen in Nederlandse bossen taxa voorkomen die op basis van de beschikbare DNA-referentiedata waarschijnlijk niet te onderscheiden zijn maar wel tot verschillende voedselgildes behoren (tabel 2.1.1). In totaal resulteert dit in 15 "probleemfamilies", 20% van het totale aantal families in Nederlandse bossen. Echter, wanneer we kijken naar de aantalsverhoudingen in een steekproef van inventarisaties uit systemen dichtbij of vergelijkbaar met de huidige studiesystemen, blijken vrijwel alle taxa uit deze families slechts zeer incidenteel voor te komen (tabel 2.1.2). Het percentage individuen in deze inventarisaties dat via DNA-analyse mogelijk niet op voedselgilde had kunnen worden ingedeeld bedraagt daar gemiddeld 4.2%. In alle vijf inventarisaties betrof het voor ruim tweederde één soort, *Hypochtonius rufulus* (Hypochtoniidae).

Onze inschatting vooraf was dan ook dat gemiddeld ruim 95% van de individuen uit monsters van de huidige studiegebieden op voedselgilde zal kunnen worden ingedeeld.

Tabel 2.1.1. *Mijtenfamilies in bosbodems met een mogelijk risico op onvoldoende potentie voor indeling tot op voedselgilde*

Risicofactor	Familie
Geen referentiedata	Belbodamaeidae
	Eulohmanniidae
	Eupalopsellidae
	Hemileidae
	Hypochtoniidae
	Labidostommidae
	Metrioppiidae
	Microzetidae
	Polyaspidae
Bevat taxa uit verschillende voedselgildes die op basis van beschikbare DNA referentiedata	Chamobatidae
	Damaeidae
	Liacaridae
	Oribatellidae
	Phthiracaridae
	Pyemotidae

Tabel 2.1.2. *Relatieve abundantie van mogelijk niet in te delen taxa in vijf voorbeeld-inventarisaties*

Locatie	Jaar	Relatieve abundantie niet in te delen taxa	
		DNA metabarcoding (schatting)	Conventioneel
De Schotkamp, Kootwijk	2007	6.5%	3.0%
Mastbos	2000	4.7%	1.7%
Mastbos	2007	8.5%	6.5%
Boswachterij Dorst	2000	1.0%	0.4%
Ulvenhout	2007	0.3%	1.3%

Ook bij conventionele methode kun je standaard een gedeelte niet tot op familie identificeren, en daardoor niet op voedselgilde indelen. Dat betreft bijvoorbeeld juveniele dieren, die nog onvoldoende onderscheidende morfologische kenmerken hebben ontwikkeld.

In de eerder genoemde 5 voorbeeld-datasets lag dat percentage op tussen de 0.4 en 6.5 % van de individuen, dus zeer vergelijkbaar met de 0.3 tot 8.5% schatting voor de DNA methode. Vaak is het percentage bij DNA net iets hoger, maar soms ook bij conventioneel (Ulvenhout). NB: dit zijn vijf voorbeelden, en een volgende keer kan het weer net iets anders uitpakken. Kortom, een detailvergelijking is gevaarlijk. Belangrijkste conclusie is dat bij beide methoden een bepaalde mate van onzekerheid bestaat, die niet sterk verschilt.

2.2 Bodemchemie

Drooggewicht en organisch stofgehalte

Om het vochtgehalte van het verse bodemmateriaal te bepalen werd het vochtverlies gemeten door bodemmateriaal in duplo af te wegen in aluminiumbakjes. De bakjes werden precies tot aan de rand afgevuld (volume = 40,5 ml), zodat de soortelijke massa van de bodem kan worden bepaald. De bodems werden gedurende minimaal 48 uur gedroogd in een stoof bij 60 °C. Vervolgens werd het bakje met bodemmateriaal opnieuw gewogen en werd het vochtverlies berekend. De fractie organisch stof in de bodem werd berekend door via het gloeiverlies bepaald. Hiertoe werd gedroogd bodemmateriaal gedurende 4 uur verast in een oven bij 550 °C. Na het uitgloeien werd het bakje met bodemmateriaal weer gewogen en werd het gloeiverlies berekend. Het gloeiverlies komt bij benadering overeen met het gehalte aan organisch materiaal in de bodem.

Water- en zoutextractie

Met een water- en zoutextractie kunnen de vrij in de bodem aanwezige ionen of de zoutuitwisselbare ionen bepaald worden. Hiervoor werd 17,5 gram verse bodem met 50 ml zoutextract (0,2 mol l⁻¹ NaCl) of 50 ml demiwater gedurende 2 uur geschud op een schudmachine bij 105 rpm. De pH werd gemeten met een HQD pH-electrode. De extracten werden gefilterd met behulp van rhizons. Voor analyse op de ICP-OES werd een deel van het filtraat aangezuurd met salpeterzuur (eindconcentratie 1%) en bewaard bij 4 °C tot verdere analyse. Voor analyse op de auto-analyzers werd niet-aangezuurd filtraat bewaard bij -18 °C tot verdere analyse.

Strontiumextractie

Met een strontiumextractie kan de concentratie strontium-uitwisselbare ionen bepaald worden. Hiervoor werd vers materiaal ingewogen overeenkomstig met 5 gram droog materiaal (minerale bodems) of 2,5 gram droog materiaal (veenbodems) en met 200 ml strontiumchloride (0,2 mol l⁻¹), geschud op een schudmachine bij 105 rpm. De pH werd gemeten met HQD pH-electrode. De extracten werden gefilterd met behulp van rhizons. Voor analyse op de ICP-OES werd een deel van het filtraat

aangezuurd met salpeterzuur (eindconcentratie 1%) en bewaard en bij 4 °C tot verdere analyse. Voor analyse op de auto-analysers werd niet-aangezuurd filtraat bewaard bij -18 °C tot verdere analyse.

Destructie

Door de bodem te destrueren (ontsluiten) is het mogelijk de totale concentratie van bijna alle elementen in het materiaal te bepalen. Hiervoor werd 200 mg fijngemalen bodemmateriaal nauwkeurig afgewogen en in teflon destructievaatjes overgebracht. Aan het bodemmateriaal werd 5 ml geconcentreerd salpeterzuur (HNO_3 , 65%) en 2 ml waterstofperoxide (H_2O_2 30%) toegevoegd, waarna de vaatjes in een destructie-magnetron (Milestone microwave type mls 1200 mega of Ethos Easy) werden geplaatst. De monsters werden vervolgens gedestruëerd in gesloten teflon vaatjes. Na destructie werd het destruaat nauwkeurig overgebracht in 100 ml maatcilinders en aangevuld tot 100 ml met demiwater. Het destruaat werd bewaard bij 4 °C tot verdere analyse op de ICP-OES.

Elementenanalyse (ICP en Autoanalyzers)

De concentraties calcium (Ca), magnesium (Mg), aluminium (Al), ijzer (Fe), mangaan (Mn), fosfor (P), zwavel (S; als maat voor sulfaat), silicium (Si) en zink (Zn) werden bepaald met behulp van een Inductively Coupled Plasma Spectrofotometer (ICP-OES, ICAP 6300, Thermo Fisher Scientific of, ARCOS MV, Spectro). De concentraties nitraat (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) en fosfaat (PO_4^{3-}) werden colorimetrisch bepaald met een Seal auto-analyser III met behulp van resp. salicylaatreagens, hydrazinesulfaat en ammoniummolybdaat/ascorbinezuur. Chloride (Cl^-) werd colorimetrisch bepaald met een Bran+Luebbe auto-analyser III systeem met behulp van mercuritiocyanide. Natrium (Na^+) en kalium (K^+) werden vlamfotometrisch bepaald met een Sherwood Model 420 Flame Photometer.

C/N analyse

Voor de analyse van de totale hoeveelheid koolstof en stikstof werd een deel van het verzamelde bodemmateriaal fijngemalen in een kogelmaler. Afhankelijk van het soortelijk gewicht van het materiaal en de verwachte concentraties, werd een kleine hoeveelheid (3-40 mg) van het gemalen materiaal in een tinnen container afgewogen, waarna het in een CNS-elementenalyzer (Vario Micro Cube, Elementar) werd geanalyseerd.

3. Veldonderzoek

In de lopende onderzoeken werden in totaal 88 locaties uitvoerig onderzocht. Van deze locaties is kennis aanwezig over boomsamenstelling, -vitaliteit, blad- en bodemchemie. Van de 88 locaties zijn er 18 met Zomereik. Met behulp van multivariate ordening op basis van P-totaal, N-totaal en silt-fractie zijn 12 locaties met eikenbossen op zand geselecteerd (tabel 1). Hiervan zijn 3 reserve, en zijn uiteindelijk 9 locaties (in drievoud) bemonsterd op microarthropoden in 2019. Een gradiënt van rijk naar arm is voor diverse elementen (P, N, Ca, Mg) te maken maar de volgorde van locaties verschuift dan soms. Dit geldt ook voor de klei en silt-fractie. Vandaar dat gekozen is om drie klassen te onderscheiden: arm, midden en rijk (tabel 3.1).

Leeftijd en de aanwezige ondergroei zijn variabelen waarop in de multivariate analyse wordt geselecteerd. De leeftijden van de bomen (tussen de 40 en 120 jaar) en de leeftijden van de boslocaties (Haas et al., 2020) werden in een eerdere fase van het achterliggende onderzoek meegenomen als variabele voor de locatiekeuze. Ondergroei van de bossen bleek niet of nauwelijks te verschillen tussen de locaties (achterliggende data Desie et al., 2020)

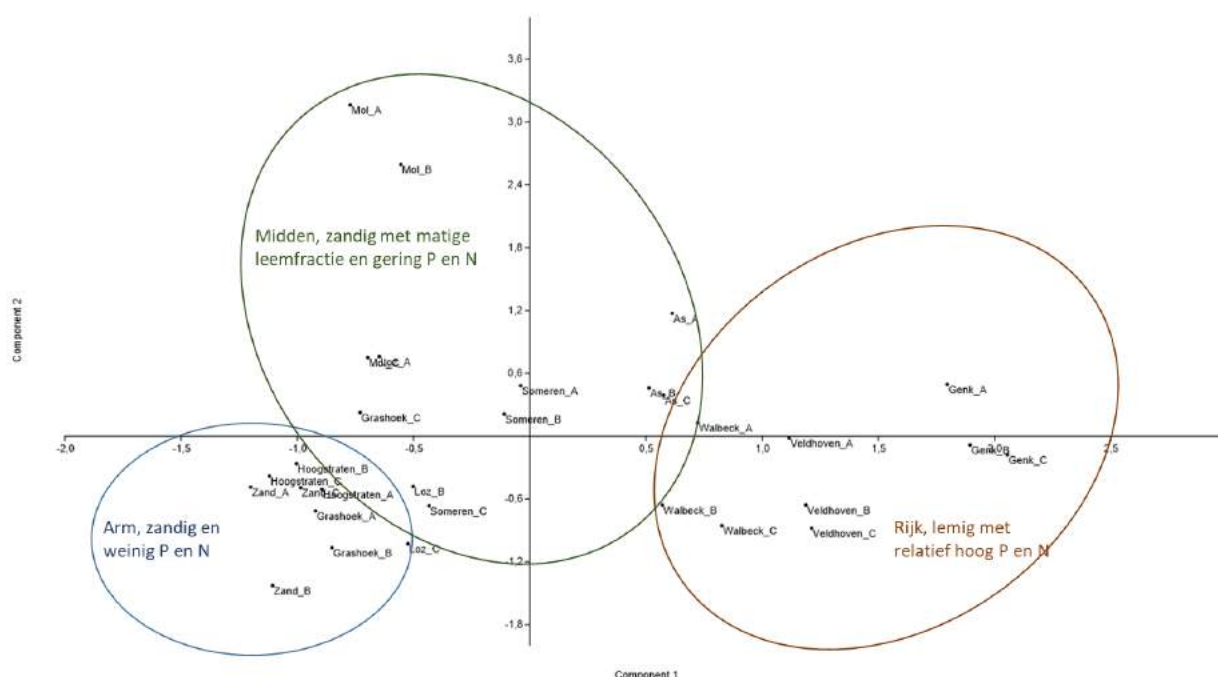
De veldstudie werd aangevuld met een Natura 2000 referentie locatie in Gelderland, het Otterlose bos. Dit is een meer natuurlijk oud bos dat minder is verzuurd, en daarom gebruikt is als donorlocatie voor de toevoeging van strooisel (fauna) in het Veluwe experiment. Voor het experiment in het Mastbos is het Ulvenhoutse voorbos (N2000) gebruikt als donorlocatie.

Op deze wijze gebruikten we locaties waarvan de bodem- en bladchemie in recente projecten door Bosgroep Zuid Nederland al zijn gemeten (Correlatieve studie strooieffecten Desie et al., 2020, BGZN et al., 2021), zodat alleen de data nog hoefden te worden verzameld van de microarthropoden. Deze zijn bemonsterd in de zomer van 2019. De chemische samenstelling van bodem, strooisel en bladeren veranderen maar langzaam. De bodemfauna reageert veel sneller op veranderingen en wordt daarom binnen één seizoen gemeten. Dit betreft aantallen mijten en springstaarten, taxonomische diversiteit via DNA metabarcoding, en functionele diversiteit in termen van voedselgilden. Dit geeft een beeld van de rol van de aangetroffen organismen in het bodemvoedselweb en hun te verwachten bijdrage aan de strooiselafbraak. Door gebruik te maken van locaties met uiteenlopende bos- en bodemkwaliteit kunnen statistische verbanden tussen de aantallen en biodiversiteit van microarthropoden en de beschikbaarheid van macro- en micronutriënten worden vastgesteld.

Om oorzakelijke verbanden en beheers opties voor verbetering van de strooiselafbraak te onderzoeken, zijn factoriële veldexperimenten nodig zoals beschreven in het volgende hoofdstuk.

Veldonderzoek 2019

Bosgroep Zuid Nederland + B-WARE + KU Leuven hebben 2 onderzoekprogramma's uitgevoerd genaamd Correlatief onderzoek Rijk-strooiselsoorten in Natuurgericht Bosbeheer-Fase1 en Fase 2. In Fase 2 zijn Zomereiken en Amerikaanse vogelkersen bemonsterd. Dit is op veel locaties gedaan en per bos zijn 4 sub-replica's (onder 4 verschillende eiken) bemonsterd. Voor de correlatieve veldstudie hebben we een arm-rijk selectie gemaakt van 10 gerepliceerde locaties. Deze selectie is gebaseerd op multivariate analyses van de bodemchemie en fysische parameters als de hoeveelheid silt/zand van alle bemonsterde locaties. Figuur 3.1 toont een multivariate analyse (PCA) voor de bodemchemie van de subsoil (20-30cm onder het maaiveld). Subsoil is hier gekozen omdat het een beter beeld geeft van de rijkdom van de locaties en minder onder invloed staat van de bomsamenstelling. De monsterpunten blijken te verschillen in de hoeveelheid silt (met name gecorreleerd met as 2) en N en P gehalte (zowel as 1 als 2). Meerdere analyses geven uiteindelijk een onderverdeling in 3 klassen van "rijkdom".



Figuur 3.1. Scatterplot van een PCA op de monsterpunten onder zomereik (C), Amerikaanse vogelkers (A) en de mengvorm van zomereik en Am. Vogelkers (B) uit het eerdere onderzoek naar invloed van Am. vogelkers op de bodem. Deze PCA is gebaseerd op de belangrijkste bodemchemische parameters van nutriëntenrijkdom (N, P), buffering (basische kationen), verzuring (pH, Al, Fe) en fysische parameters zoals percentage organische stof en percentage silt, klei en zand in de subsoil (20-30cm -mv).

Figure 3.1. PCA scatterplot for the sample locations with pedunculate oak (C), black cherry (A) and the mixture of pedunculate oak and black cherry (B) from a previous study on the effect of admixture on the soil. The PCA is based on the most important biochemical parameters for nutrients (N, P), buffering (base kations), acidification (pH, Al, Fe) and physical parameters such as percent organic matter, percent silt, clay or sand in the subsoil (20-30 cm below surface).

Door de selectie verkrijgen we 30 meetpunten. De selectie en ordening in klassen van rijkdom voor de uiteindelijke 9 locaties staat in tabel 3.1. De tiende locatie is het Otterlose bos (Natura 2000 referentie).

Tabel 3.1. Selectie van 9 locaties voor het verdere veldonderzoek. Per locatie zijn 3 replicaties (plots) beschikbaar.

Table 3.1. Selection of the 9 locations for further field work. 3 replication plots are available at each location.

ARM	MIDDEN	RIJK
Hoogstraten	Loon op Zand	Genk Strip
't Zand	Someren	Veldhoven
Grashoek	As	Walbeck

Op deze 10 locaties met 3 herhalingen voor het veldonderzoek zijn in mei 2019 de microarthropoden bemonsterd in de organische laag (strooisel) en de minerale bodem van 0 tot 10 cm diepte. Dit gaf in totaal $10 \times 3 \times 2 = 60$ monsters. De microarthropoden zijn geëxtraheerd, de aantallen microscopisch geteld en het DNA geanalyseerd. Daarna werden de resultaten verder uitgewerkt tot aantallen per m², taxonomische diversiteit (aantal taxa en Shannon index) en functionele diversiteit in termen van voedselgilden. Hierbij zijn de volgende groepen onderscheiden:

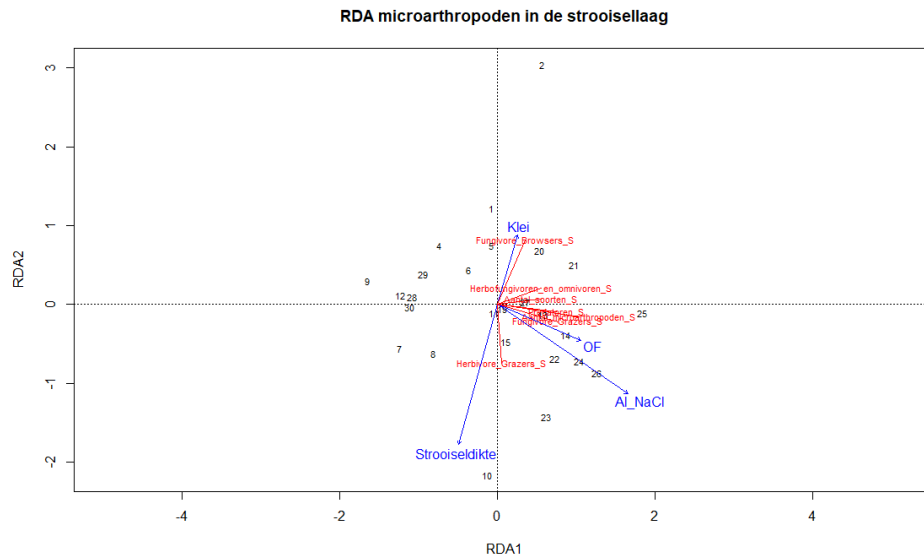
- Fungivore browsers
- Fungivore grazers (oribatide mijten)
- Herbivore browsers
- Herbivore grazers
- Herbofungivoren+omnivoren
- Predatoren

Met DNA metabarcoding kon 5% niet worden geïdentificeerd en ingedeeld. Dit komt overeen met de verwachting (risico inschatting vooraf onder 2.1).

Het voorkomen van microarthropoden werd geanalyseerd aan de hand van een multivariate analyse en meervoudige lineaire modellen. Hierbij werden de aantallen van functionele groepen (voedselgilden) en de bodemchemie (zoutextracten) van de 0-10 cm minerale bodem allereerst beoordeeld op normaliteit. Een selectie van de te analyseren variabelen werd gemaakt op basis van een correlatiematrix, een PCA en vervolgens een RDA. Hierbij werd gebruik gemaakt van een stepwise selection (voorwaards en achterwaards). Sterk gecorreleerde variabelen werden niet gezamenlijk geanalyseerd. Vervolgens werden de, uit de ordinatie voortkomende, verklarende variabelen geanalyseerd met gemengde modellen (mixed models) om de effectgrootte van de variabelen op het voorkomen van de functionele groepen van microarthropoden weer te geven. Hierbij werd rekening gehouden met het feit dat er 3 monsterpunten per locatie (bos) aanwezig zijn door deze als random effect mee te nemen in de modellen. De effectgroottes van de variabelen werden berekend waarbij rekening werd gehouden met mogelijke verschillen tussen locaties.

Strooisellaag

Een multivariate analyse op het voorkomen van microarthropoden in de strooisellaag toont dat Strooiseldikte en dikte OF laag, aluminium gehalte en klei belangrijke parameters zijn die de verschillen in soortgroepen tussen de locaties verklaren (figuur 3.2). Strooiseldikte bleek positief gerelateerd aan het aantal herbivore grazers in het strooisel. Het kleigehalte blijkt positief gerelateerd aan het aantal fungivore browsers.



Figuur 3.2. RDA met voedselgroepen in de strooisellaag en milieuvariabelen na stapsgewijze selectie van deze variabelen. De blauwe pijlen tonen de milieuvariabelen die na stepwise reductie als significant overbleven in het model. De rode pijlen tonen de responsvariabelen. Locaties worden weergegeven met de getallen. (Schaling op basis van gewogen gemiddelde tussen variabelen)

Figure 3.2. RDA based on feeding guilds in the litter layer and environmental parameters after stepwise selection of these parameters. Blue arrows indicate significant environmental variables after stepwise reduction. Red arrows indicate response variables. Locations are indicated with numbers. (Average weighted means are used for scaling).

Een gevonden effect kan echter afhankelijk zijn van een specifieke locatie waar beheer of klimaat (parameters die niet zijn meegenomen in de analyse) een rol kunnen spelen. Om deze reden zijn per groep de milieuvariabelen geanalyseerd in mixed models waarin "locatie" als effect is meegenomen. Hierdoor zijn we beter in staat te corrigeren voor mogelijke onbedoelde interacterende effecten. In tabel 3.2 staan de samenvattingen van deze analyses. Alleen de significante variabelen hebben een invulling in de tabel gekregen. De pijlen tonen de richting van het significante effect en de sterkte daarvan wordt weergegeven door de ster-notaties. Uit de analyse blijkt bijvoorbeeld dat het totaal aantal microarthropoden in de strooisellaag toeneemt naarmate de aluminiumconcentraties in de bodem hoger zijn en de basenverzadiging lager. Dit is dus een sterke relatie met de zuurgraad (ook al valt pH als significante variabele uit de vergelijking). Het aantal fungivore browsers daarentegen neemt toe wanneer de basenverzadiging en de hoeveelheid basische kationen in de bodem toeneemt en de strooiseldikte lager is.

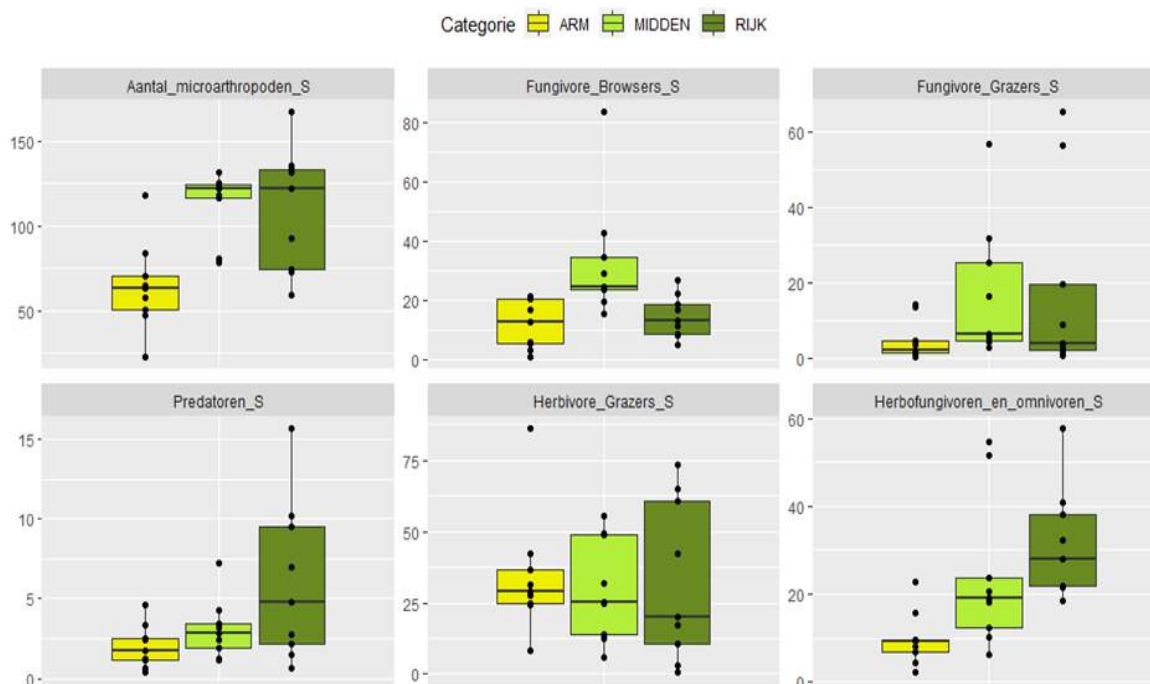
Tabel 3.2. Resultaten van de lme modellen voor de microarthropoden in de strooisellaag. Getoond zijn de richtingen van effect van de verklarende milieuvariabelen. Significantieniveau: . = $p < 0.1$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positieve effecten zijn weergegeven met opwaartse pijlen. Negatieve effecten zijn weergegeven met neerwaartse pijlen.

Table 3.2. Results of lme models for microarthropods in the litter layer. Arrows indicate the direction of the effect of environmental variables. Significance levels are: . = $p < 0.1$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positive effects are shown as upward arrows, negative effects are shown as downward arrows.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal aantal microarthropoden	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen	↑***	↑*			↑**		
	basenverzadiging	↑*		↓*			↓.	
Zuurgraad	pH			↑*				
	Al						↑**	
Eutrofie	NH4							
	NO3					↑***		
	P							
	Mn							
Habitat	Organische stof							
	Strooiseldikte	↓**						
	Klei			↓*		↑*		
	Silt							
	OF	↓**						
	CN							

Wanneer we de boslocaties samennemen op basis van de eerste categorisering (in arme-middel-rijke locaties) dan zien we dat de aantallen microarthropoden in de rijkere bossen toe lijken te nemen naarmate de bossen wat rijker zijn (figuur 3.3).

Bodembiota in de Strooisellaag (aantal x 1000/m²)



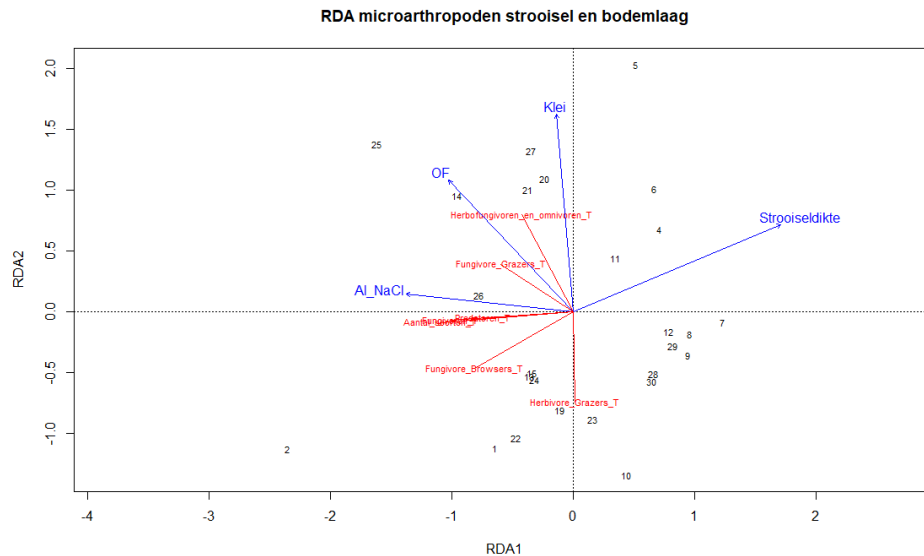
Figuur 3.3. Boxplots van aantallen microarthropoden in de 3 onderzochte typen boslocaties (arme locaties, met laag silt gehalte en lage nutriëntgehalten en rijke locaties met een relatief hoge silt/klei fractie en wat hogere P gehalten in de bodem. Midden locaties liggen hier vanzelfsprekend tussenin).

Figure 3.3. Boxplots of number of microarthropods in the 3 categories of forest locations (poor locations with low silt percentage and low nutrient content, rich locations with a relative high silt/clay content and high P concentrations and a middle category that is in between these categories).

Bodem + Strooisellaag

Bovenstaande analyse is ook uitgevoerd voor de microarthropoden in de bodemlaag. Onderstaande figuren geven de resultaten voor de optelsom van microarthropoden in bodem + strooisellaag (dus het totaal aan gevonden microarthropoden).

De resultaten laten zien dat dikte van OF laag, strooiseldikte, kleigehalte en aluminium van belang zijn voor het verklaren van verschillen in microarthropoden in de bodem en strooisellaag samen. Locaties met een hogere buffering hebben een hogere pH en minder aluminium in de bodem en strooisellaag samen (zie bijlage 1, correlatiematrixen). Ook is de strooisellaag op deze locaties dunner. De strooiseldikte is negatief gerelateerd met het totaal aantal fungivore browsers (figuur 3.4). Omnivoren lijken vaker voor te komen bij hogere kleifracties en een dikkere F laag.



Figuur 3.4. RDA met voedselgroepen in de bodem en milieuvariabelen na stapsgewijze selectie van deze variabelen. De blauwe pijlen tonen de milieuvariabelen die na stapsgewijze selectie als significant overbleven in het model. De rode pijlen tonen de responsvariabelen. Locaties worden weergegeven met de getallen. (Schaling op basis van gewogen gemiddelde tussen variabelen) .

Figure 3.4. RDA based on feeding guilds in the soil layer and environmental parameters after stepwise selection of these parameters. Blue arrows indicate significant environmental variables after stepwise reduction. Red arrows indicate response variables. Locations are indicated with numbers. (Average weighted means are used for scaling).

Vervolgens is per groep onderzocht welke (combinatie van) milieuvariabelen het beste het voorkomen (en aantallen) van deze groep (in bodem en strooisellaag samen) verklaart (zie tabel 3.3). Hiervoor zijn lineair mixed models gebruikt zodat rekening kon worden gehouden met meerdere metingen per locatie (locatie meegenomen als random effect). Alle verklarende variabelen zijn hiervoor gestandaardiseerd, zodat variabelen met verschillende eenheden met elkaar vergeleken kunnen worden.

Verzuring wordt doorgaans gekenmerkt door een hogere aluminium concentratie, een lagere pH en lagere concentraties basische kationen. De concentratie basische kationen is negatief gecorreleerd met het voorkomen van totaal aantal omnivoren. Ook de aluminium gehalten en de pH wijzen in deze richting voor de omnivoren. We zien echter in de bodem en strooisellaag samen ook enkele tegenstrijdige patronen (zoals een positieve relatie tussen aantal fungivoren en de basenverzadiging terwijl pH en aluminium in tegengestelde richting wijzen).

Tabel 3.3. Resultaten van de lme modellen voor de microarthropoden in zowel strooisel als bodemlaag samen. Getoond zijn de richtingen van effect van de verklarende milieuv variabelen. Significantieniveau: . = $p < 0.1$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positieve effecten zijn weergegeven met opwaartse pijlen. Negatieve effecten zijn weergegeven met neerwaartse pijlen.

Table 3.3. Results of lme models for microarthropods in both the litter and soil layer. Arrows indicate the direction of the effect of environmental variables. Significance levels are: . = $p < 0.1$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positive effects are shown as upward arrows, negative effects are shown as downward arrows.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal Fungivoren	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen				↓ ***	↓ ***		
	basenverzadiging					↑ ***	↑ **	
Zuurgraad	pH				↓ **		↓ **	
	Al				↑ **		↑ *	↑ ***
Eutrofie	NH ₄							
	NO ₃				↑ **	↑ ***	↓ *	
	P					↓ ***		
	Mn					↑ **		
Habitat	Organische stof		↑ *					
	Strooiseldikte	↓ ***			↓ ***	↑ **		↓ ***
	Klei			↓ **		↓ ***		
	Silt			↓ *		↑ ***		
	OF			↓ *	↑ ***			↑ **
	CN				↓ *	↓ ***	↓	

Ondanks dat de bodembiota niet in de strooisellaag zijn bemonsterd (maar in de organische F+OH- en 10 cm minerale bodemlaag) lijkt er toch een negatief verband te zijn met de strooiseldikte voor enkele van de gevonden groepen. Echter deze relaties (ook al zijn ze wel significant) zijn niet sterk (zie bijlage 1). De CN ratio werd recent gezien als een slechte voorspeller voor de strooiselafbraak en humuskwaliteit (Desie et al 2020). In dit onderzoek zien we CN wel positief gerelateerd zijn aan herbivore grazers en negatief met totaal aantal microarthropoden in de bodemlaag (data in bijlage 1).

Conclusies relaties microarthropoden en bodemchemie in veldstudie

- De pH is positief gerelateerd aan basenverzadiging en lijkt ook hoger in de rijkere boslocaties (direct onder invloed van Am. Vogelkers)
- Basische kationen (som Mg, Ca en K) zijn positief gecorreleerd met fungivore browsers en predatoren in de strooisellaag.
- Locaties met hogere buffering, hogere pH en minder aluminium hebben een dunnere strooisellaag.
- Strooiseldikte is negatief gerelateerd aan het totaal aantal fungivore browsers in de strooisellaag en in de beide lagen, het aantal fungivore browsers en het totaal aantal microarthropoden. Nitraat is positief gecorreleerd met predatoren.
- CN ratio van de bodemlaag is negatief gerelateerd met aantal omnivoren en predatoren in de bodemlaag maar heeft verder geen verklarende rol.

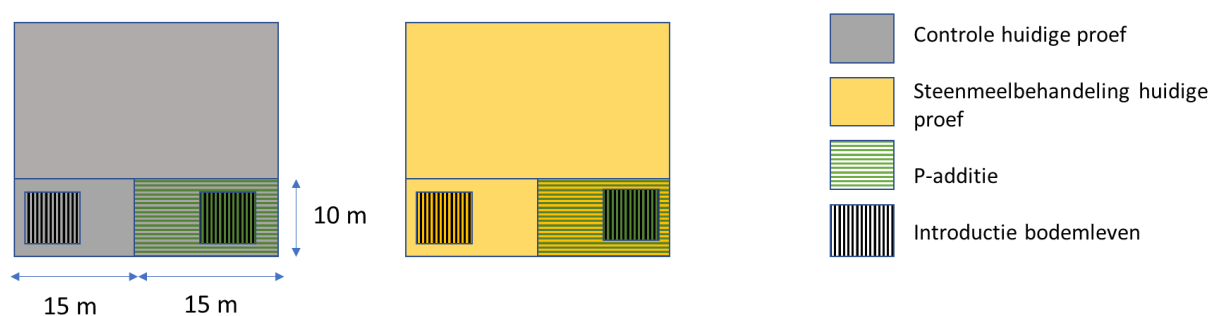
4. Experimenten

4.1 Aanpak

Omdat veranderingen in de bodem langzaam gaan, en effecten van steenmeel naar verwachting pas na 3 tot 5 jaar meetbaar zouden worden, werden deze experimenten ingezet binnen het al lopende project 'Herstel loofbossen op droge zandgronden', OBN 2015-73-DZ (de Vries et al., 2019). Zoals weergegeven in figuur 4.1.1 kon deze nieuwe proef in de lopende proef worden ingepast zonder deze ernstig te verstoren. Door gebruik te maken van de al bestaande proeflocaties in loofbos werd een tijdswinst van drie effectjaren geboekt omdat de steenmeelbehandelingen al in maart 2016 werden toegediend. Dit betekent dat de bodem meer tijd heeft gehad voor herstel, voordat de extra bodemfauna via het strooisel van de donor locaties werd toegevoegd, waardoor de kans op overleving werd verhoogd. De steenmeel experimenten in het Mastbos en op de Hoge Veluwe, met een (*"randomized block design"*) van 3 proefvlakken (30 x 30 m) werden in februari 2019 uitgebreid met een *split plot* (10 x 15 m) opzet die resulteert in 8 behandelingen binnen de bestaande proefvlakken. Op deze manier werd gekozen voor twee identieke deelexperimenten op twee locaties (Mastbos en Hoge Veluwe) met ieder drie replica's per behandeling (zie voor gedetailleerder schema bijlage 2), waardoor het onderscheidend vermogen van de statistische analyse werd verhoogd door de zo gerealiseerde verdubbeling van aantal replicaties per behandeling.

In het al lopende OBN-project zijn in zowel het Mastbos als het Nationaal Park de Hoge Veluwe twee soorten steenmeel toegediend (10 ton/ha, voor verantwoording van deze steenmeelkeuzes zie het eerste tussenrapport van dit project, De Vries et al., 2017). Er werd voor de proefvlakken met Soilfeed gekozen omdat dit type steenmeel in tegenstelling tot Eifelgold veel minder P bevat (7 versus 22 kg P/ha), terwijl het ook minder snel werkt dan met Eifelgold. Met Soilfeed is er dus veel minder risico op overlap met de kunstmest P behandeling en kunnen de effecten van steenmeel en P beter worden gescheiden. Op basis van literatuuronderzoek werd bepaald hoeveel P moest worden opgebracht en in welke vorm. Er was binnen het consortium al ervaring met het toedienen van P in het kader van het OBN-project OBN 2012-31-DZ-Fosfaattoevoeging Heide (Vogels et al., 2016), en de verwachting was dat een zelfde toedieningsstrategie met een vergelijkbare dosering ook voor dit experiment geschikt zou zijn.

Voor de toediening van bodemleven werd op elke locatie binnen een straal van enkele kilometers grond van de L- en H-laag verzameld op een donorlocatie met een goede bodemkwaliteit (Wubs et al., 2016). De donorgrond werd verspreid op veldjes van 4x4 m in de *split-plots*. Hierbij werd ongeveer 1 liter bodemmateriaal per m² verspreid. Dat leidde tot een laagje donorbodem van gemiddeld 1 mm. Een plot-oppervlak van 16 m² is ruim voldoende voor de bodemecologie en beperkt het verstorende effect op de donorlocatie.



Figuur 4.1.1. Full factorial veldexperiment: inpassing van een splitplot proef met toevoeging van P en bodemfauna in de lopende steenmeel experimenten Mastbos en Hoge Veluwe. Zie bijlage 2 voor details.

Figure 4.1.1. Full factorial field experiment: split-plot experiment with addition of phosphorus and fauna in the ongoing experiment with addition of rock powder in the Mastbos and the Hoge Veluwe (details in attachment 2).

Opzet

We gingen uit van twee driejarige experimenten (Mastbos en Veluwe), geplaatst in de al drie jaar lopende steenmeel experimenten van OBN-project 2015-73-DZ. Op elke locatie werd dus een blokkenproef uitgevoerd met 3 herhalingen van 8 behandelingen zoals weergegeven in tabel 4.1.1, waardoor per locatie 24 proefvlakken ontstonden.

Tabel 4.1.1. Full factorial veldexperiment: factoren en behandelingen. Nul (0) is de controle. Fosfor (P), steenmeel (S) en fauna (F) werden in alle mogelijke combinaties getest.

Table 4.1.1. Full factorial field experiment: factors and treatments. Controle = 0, phosphorus = P, rock powder = S and fauna is F.

		Fosfor P	Steenmeel S	Fauna F
	Behandeling			
1	PSF	1	1	1
2	PF	1	0	1
3	SF	0	1	1
4	F	0	0	1
5	PS	1	1	0
6	P	1	0	0
7	S	0	1	0
8	0	0	0	0

Metingen

In elk proefvlak werd in elk deelexperiment het volgende vastgelegd:

	Analyses	
Jaar 1	Strooisel	C/N, Uitwisselbare basische kationen (Ca, K en Mg), ammonium, nitraat, uitwisselbaar aluminium, bodem pH, , plantenbeschikbaar fosfaat en de totale concentratie P, Al, Fe, Ca, K en Mg.
	Bodem 0-10 cm	C/N, Uitwisselbare basische kationen (Ca, K en Mg), ammonium, nitraat, uitwisselbaar aluminium, bodem pH, basenverzadiging, CEC, plantenbeschikbaar fosfaat
Jaar 2	Geen metingen	
Jaar 3	Strooisel	C/N, Uitwisselbare basische kationen (Ca, K en Mg), ammonium, nitraat, uitwisselbaar aluminium, bodem pH, , plantenbeschikbaar fosfaat
	Bodem 0-10 cm	C/N, Uitwisselbare basische kationen (Ca, K en Mg), ammonium, nitraat, uitwisselbaar aluminium, bodem pH, basenverzadiging, CEC, plantenbeschikbaar fosfaat
	Strooisel	Microarthropoden: aantallen mijten en springstaarten, taxonomische diversiteit via DNA metabarcoding, functionele diversiteit in termen van voedselgilden
	Bodem 0-10 cm	Microarthropoden: aantallen mijten en springstaarten, taxonomische diversiteit via DNA metabarcoding, functionele diversiteit in termen van voedselgilden

De bladchemie werd niet gemeten in de experimenten omdat we op basis van het lopende project geen significante effecten verwachtten binnen de 3 jaar van dit project. Bovendien staan er te weinig bomen voor een betrouwbare meting in vakken die kleiner zijn dan 30x30 m.

In februari 2019 zijn de splitplot proeven met toevoeging van P en bodemfauna (strooisel) ingepast in de lopende steenmeel experimenten Mastbos en Hoge Veluwe. In de tweede helft van februari zijn de P bemestingen van 50 kg P per hectare toegediend in de vorm van natriumdiwaterstoffosfaat dihydraat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Deze stof heeft als voordeel dat er geen andere werkzame meststoffen mede worden toegediend, zoals wel het geval is bij gebruik van reguliere P-meststoffen. Daarnaast is P in deze vorm snel beschikbaar. De toediening is uitgevoerd met behulp van reguliere rugspuiten (figuur 4.1.2) in een oplossing van 0,25 kg meststof per liter (0,05 kg P per liter; 15 liter per plot).

Op beide locaties is de P bemesting uitgevoerd op de proefvlakken met Soilfeed (voorheen Lurgi genaamd).



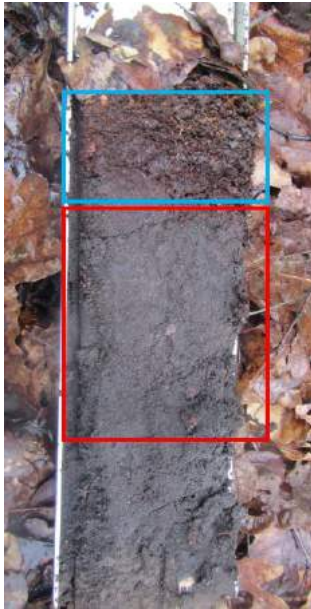
Figuur 4.1.2. *P-bemesting op de Hoge Veluwe met een rugspuit.*
Figure 4.1.2. *Adding P in the plots of the Hoge Veluwe.*

In de tweede helft van maart 2019, een maand na de P-bemesting, is het strooisel van de donorlocaties verzameld en uitgestrooid (1 liter per m², ofwel 1 mm/ per m²). De donorlocaties waren de oude bosgroeiplaatsen Ulvenhoutse bos (N. Brabant) en Otterlose bos (Veluwe). Op die locaties is plaatselijk materiaal van de F- en H-laag verzameld (figuur 4.1.3), en vervolgens opgebracht op de proefvlakken. Daarbij is eerst de aanwezige L-laag aan de kant geharkt met een bladhark. Vervolgens is het elders verzamelde materiaal uitgestrooid en is de aan de kant geharkte L-laag weer teruggebracht. In het Mastbos werd materiaal van het Ulvenhoutse bos opgebracht en in de Hoge Veluwe werd materiaal van het Otterlose bos opgebracht.



Figuur 4.1.3. *Verzamelen van strooisel van de donorlocatie Otterlose bos.*
Figure 4.1.3. *Collection of litter in the donorsite the Otterlose bos.*

De experimenten werden in de winter van 2019/2020, en ruim twee jaar na toediening van P en strooisel met bodemfauna (F) in juni 2021 bemonsterd en geanalyseerd op chemie in de ecto-organische (F+OH-laag) en bovenste minerale bodemlaag (0-10 cm) (figuur 4.1.4). Vlak daarvoor, in eind mei 2021 werden de microarthropoden in de organische laag (strooisel) en bodem bemonsterd.



Figuur 4.1.4. Overzicht van de ecto-organische (F+OH-laag; blauw gearceerd) en bovenste minerale bodemlaag (0-10 cm; rood gearceerd).

Figure 4.1.4. View of the ecto-organic layer (F+OH-layer; blue rectangle) and the top layer of the mineral soil (0-10 cm; red rectangle).

Statistische analyse

Verschillen tussen behandelingen in bodemchemie werden per jaar getoetst in R 4.0.3 (R Core Team, 2020). Omdat de gegevens niet normaal verdeeld waren, werd een Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace Approximation) [glmerMod] Family uitgevoerd: Gamma (identity) of Gamma (log). In eerste instantie werd per gebied en bodemlaag alle toedieningen (P, steenmeel en bodemfauna enten) en mogelijke interacties getoetst waarbij de toediening als fixed-factor en de proefvlakken als random-factor werden meegenomen. Wanneer mogelijk, werd het model versimpeld door niet significante interacties en/of factoren eruit te halen. Als in beide gebieden dezelfde effectrichting aanwezig was, werden beide gebieden ook samen getoetst.

Analyses van de aantallen mijten en springstaarten, en van de voedselgilden, werden uitgevoerd met SPSS Statistics 25 (IBM). In het algemeen waren de aantallen niet normaal verdeeld (beoordeeld via Q-Q plots) en voldeden daardoor niet aan de voorwaarden voor een anova (variantie analyse van de factoren steenmeel, fosfor en fauna). De effecten van de 3 behandelingen (3 factoren, elk met 2 niveaus) werden vervolgens voor elke factor apart getest met de niet parametrische Mann-Whitney toets. Hierbij worden geen aannamen gedaan over de verdeling.

4.2 Bodemchemie

Resultaten experimenten – bodemchemie

In dit hoofdstuk worden eerst de algemene verschillen tussen het Mastbos en de Veluwe beschreven. Vervolgens worden de effecten van de behandelingen op de twee bodemchemische knelpunten voor bodemfauna beschreven, namelijk P-limitatie en een te geringe bodembuffering.



Figuur 4.2.1 Indruk van de proefvlakken in de Veluwe (linksboven winter 2019/2020 en onder zomer 2021) en het Mastbos (rechtsboven winter 2019/2020).

Figure 4.2.1. Impression of the sites in the Hoge Veluwe (top left: winter 2019/2020 and bottom: summer 2021) and the Mastbos (top right: winter 2019/2020).

Algemene beschrijving Mastbos en Veluwe

Het Mastbos werd gekenmerkt door een dichte ondergroei van Adelaarsvaren (figuur 4.2.1). De dikte van de organische F+OH-laag varieerde van circa 4 tot 7 cm. In de F+OH-laag werd veruit het meeste organisch stof gemeten met gemiddeld 70% tegen 10% in de minerale bodemlaag (gegevens zomermeting 2021). De C/N-ratio was gemiddeld 19 g/g in de F+OH-laag en was wat hoger in de minerale bodemlaag met 23 g/g. In de Veluwe bestond de meer open ondergroei voornamelijk uit grassen (Bochtige smele en Pijpenstrootje) en mossen. De dikte van de organische F+OH-laag varieerde van circa 2 tot 6 cm en was vaak sterk variabel binnen de proefvlakken. Het organisch stofgehalte was gemiddeld 65% in de F+OH-laag tegen 5% in de minerale bodemlaag. De C/N-ratio was gemiddeld 19 g/g in de F+OH-laag en was wat hoger in de minerale bodemlaag met 22 g/g.

In de F+OH-laag werden in de zomer van 2021 vergelijkbare NO₃-concentraties gemeten in de onbehandelde controle van 227 µmol/l in het Mastbos en 104 µmol/l in de Veluwe (tabel 4.2.1.). In de minerale bodemlaag werd in het Mastbos een nitraatconcentratie van 172 µmol/l bodem gemeten tegen een veel lagere nitraatconcentratie in de Veluwe van slechts 56 µmol/l bodem. De ammoniumconcentratie gemeten in de F+OH-laag was gemiddeld hoger in het Mastbos met 517 µmol/l bodem tegen 323 µmol/l bodem in de Veluwe. In de minerale bodem waren de NH₄-concentraties over het algemeen lager met 104 µmol/l in de Veluwe en 32 µmol/l bodem in het Mastbos. Ook in totaal-N (via C/N-analyse) verschilden de twee gebieden. In het Mastbos was de totale N-concentratie in de F+OH-laag gemiddeld hoger ten opzichte van de Veluwe met 21 tegen 16 mg/g. In de minerale bodemlaag werd geen verschil in totaal-N tussen de gebieden gemeten (gemiddeld 2 mg/g). De proefvlakken in het Mastbos waren niet alleen rijker in stikstof maar ook aan fosfor. De vrij oplosbare P-concentratie (gemeten in het zoutextract) was duidelijk hoger in de F+OH- en minerale bodemlaag van het Mastbos met 104 en 36 µmol/l tegen 55 en 7 µmol/l in F+OH- en minerale bodemlaag van de Veluwe (gegevens zomer 2021). In het Mastbos werd dus ruim twee keer zoveel vrij oplosbaar P gemeten dan in de Veluwe. Naast stikstof en fosfor verschilden de gebieden ook qua bodembuffering. De proefvlakken in de Veluwe en Mastbos weinig gebufferd met een basenverzadiging van 12% (CEC van 34 meq/l bodem) en pH-NaCl van 3,1 in de minerale bodem van de Veluwe en een basenverzadiging van 9% (CEC van 51 meq/l bodem) en pH-NaCl van 2,8 in de minerale bodemlaag van het Mastbos.

Tabel 4.2.1. Gemiddelde bodemchemische parameters per gebied gemeten in zoutextractie (0,2 M NaCl) waarbij concentraties in µmol/l zijn gegeven, strontiumextractie met basenverzadiging (BV) in procenten en cation exchange capacity (CEC) in meq/l bodem, organisch stof in procenten en C/N-ratio en totaal-N uit een C/N-analyse in de onbehandelde proefvlakken in de zomer van 2021.

Table 4.2.1. Soil chemistry data. Values measured in 0.2 M NaCl extract in µmol/l. Base saturation (%) and cation exchange capacity (CEC) in meq/l soil measured in the SrCl₂-extract, organic matter in percentage and C/N-ratio and total-N measured in C/N-analysis in the control treatments in the summer of 2021.

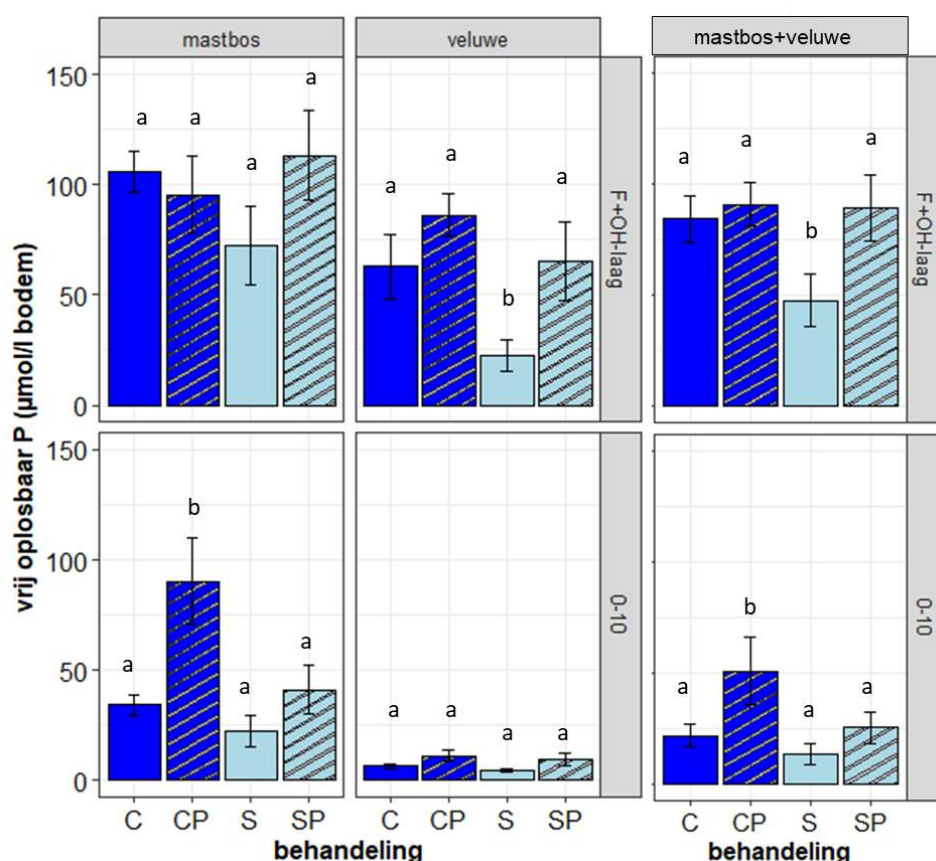
gebied	diepte	OS %	Zoutextract				Strontiumextract		C/N-analyse	
			pH	P	NO ₃	NH ₄	BV	CEC	CN	totaal-N
				µmol/l			%	meq/l	g/g	mg/g
Veluwe	F+OH	65	2,9	55	159	322	47	50	19	16
	0-10	5	3,1	7	56	104	12	34	22	2
Mastbos	F+OH	70	2,9	104	227	517	55	45	19	21
	0-10	10	2,8	36	172	32	9	51	23	2

Effect van de behandelingen op het opheffen van P-limitatie

In de winter van 2019/2020 was de concentratie vrij oplosbaar P na de P-gift verdubbeld in de twee bodemlagen van beide gebieden vergeleken met de onbehandelde controle (Bloem et al., 2020). In de zomer van 2021 was dit verschil niet meer aanwezig, met uitzondering van de minerale bodemlaag in het Mastbos (figuur 4.2.2). Een vergelijkbaar beeld was te zien voor de concentratie plantbeschikbaar fosfaat (Olsen-P). In de winter van 2019/2020 werd in de F+OH-laag van het Mastbos in de behandeling met steenmeel een lagere vrij oplosbare P-concentratie gemeten. In de zomer van 2021 was dit verschil niet significant, maar waren de concentraties wel lager in vergelijking met de controle. Ook werd in 2021 in de Veluwe in de F+OH-laag een significant lagere vrij oplosbare P-concentratie gemeten met steenmeeltoediening (gemiddeld 23 tegen 63 $\mu\text{mol/l}$ in de controle). Hetzelfde beeld was zichtbaar als de twee gebieden samen werden getoetst. In de behandeling met steenmeel en P was de vrij oplosbare P-concentratie vergelijkbaar met de enkel P-gift in de F+OH-laag en minerale bodemlaag van de Veluwe en de F+OH-laag van het Mastbos.

Zowel in de winter van 2019/2020 en de zomer van 2021 was de concentratie vrij oplosbaar P in de minerale bodemlaag van het Mastbos lager in de gecombineerde behandeling van steenmeel met P ten opzichte van de enkel P-behandeling, maar vanwege de grote variatie niet significant. Voor de Olsen-P concentratie in de minerale bodem werd in het Mastbos in 2021 een significant effect gemeten in de P-behandeling met bodemfauna. In deze behandeling was de Olsen-P concentratie hoger ten opzichte van de enkel P-behandeling. Voor de concentratie vrij oplosbaar P werd een vergelijkbaar patroon gevonden, echter niet significant.

De bodemfauna werd toegediend met strooisel in een dosering van 1 liter per vierkante meter. Dit komt overeen met 1 mm per m². De dikte van de strooisellaag (organische F+OH-laag) in het Mastbos varieerde van circa 4 tot 7 cm. Het toegevoegde strooisel was dus ongeveer 2% van de dikte van de al aanwezige laag.



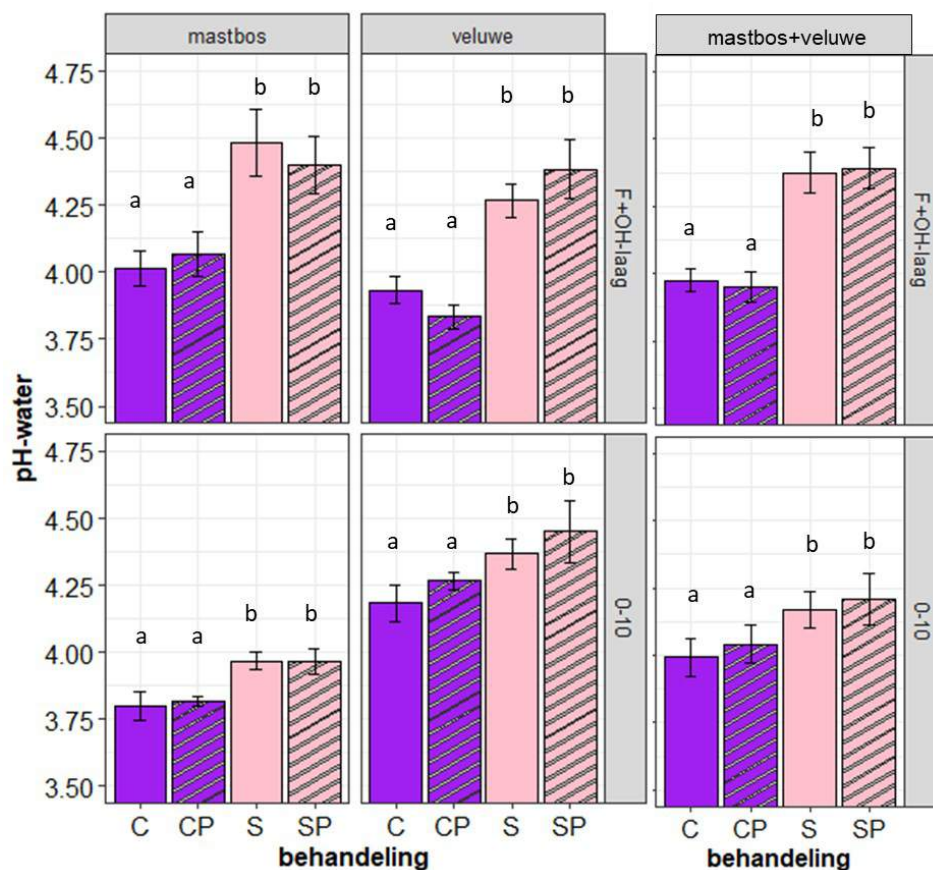
Figuur 4.2.2. Concentratie vrij oplosbaar P (gemeten in een zoutextract) in $\mu\text{mol/l}$ in de zomer van 2021 per behandeling. C=controle, P=P-toediening, S=steenmeeltoediening. Verschil in kleur geeft behandeling met steenmeel weer en arcering geeft P-behandeling weer. Gemiddelde $\pm$ st.fout, verschillende letters geven significant verschil t.o.v. controle weer ($p < 0,05$).

Figure 4.2.2 P-concentration measured in 0.2 M NaCl extract in $\mu\text{mol/l}$ soil in the summer of 2021 per treatment. C=control, P=P-addition and S=rock powder addition. Addition of rock powder represented with lighter colours and addition of P represented in stripes. Average $\pm$ standard error, different letters represent significant difference with control ($p < 0,05$).

Effect van de behandelingen op het verbeteren van de bodembuffering

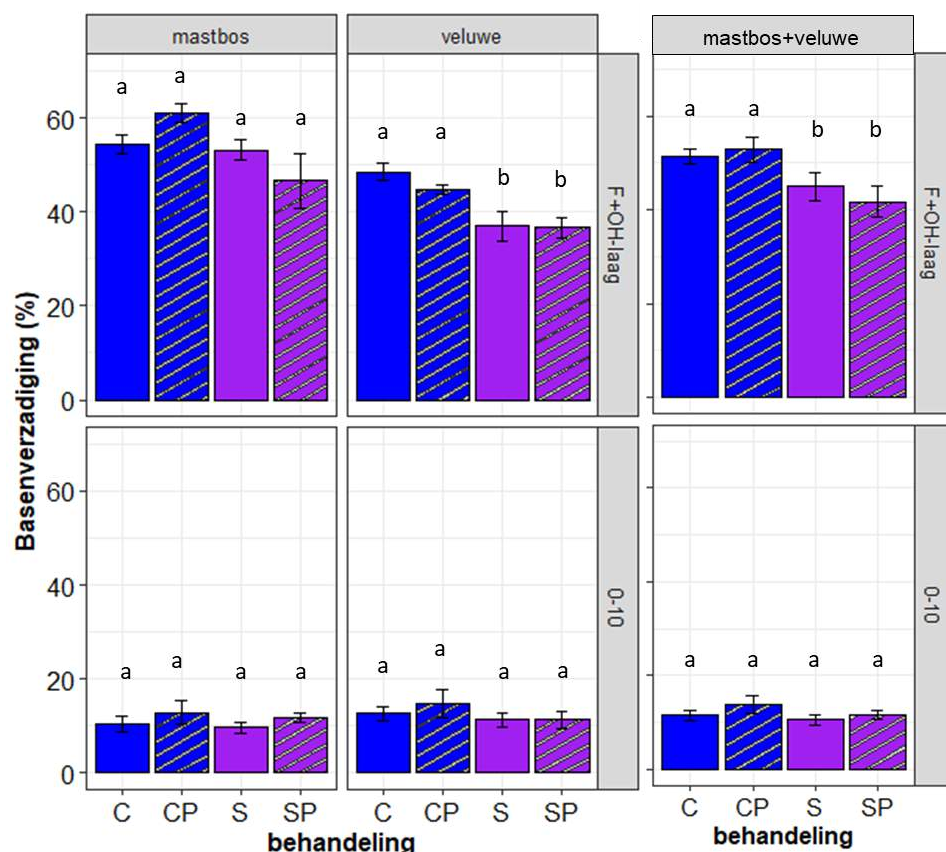
Het toedienen van het steenmeel Soilfeed resulteerde 4 en 5 jaar na toediening (winter 2019/2020 en zomer 2021) in beide terreinen tot een significante toename in pH-water in de F+OH-laag (Bloem et al., 2020 en figuur 4.2.3). In de zomer van 2021 werd in de F+OH-laag van de met steenmeel behandelde proefvlakken een toename in pH-water van ongeveer 0,4 pH-eenheden gemeten ten opzichte van de onbehandelde controle tot een pH van gemiddeld 4,5 in het Mastbos en 4,3 in de Veluwe. Ook in de minerale bodemlaag nam de pH-water significant toe ten opzichte van de onbehandelde controle met 0,2 pH-eenheden naar een pH-water van 4,0 in het Mastbos en 4,3 in de Veluwe. Er werden bijna geen effecten van steenmeeltoediening gemeten op de CEC met uitzondering van de F+OH-laag in het Mastbos in de zomer van 2021. In het Mastbos werd met steenmeeltoediening een significant hogere CEC gemeten van gemiddeld 52 meq/l tegen 43 meq/l in de behandelingen zonder steenmeel. Wat de basenverzadiging betreft werd in de winter van 2019/2020 een significante toename gemeten in de F+OH-laag van beide gebieden en in de minerale bodemlaag van het Mastbos. In de zomer van 2021 werd enkel in de F+OH-laag van de Veluwe een significant effect op de basenverzadiging gemeten en was deze in de behandeling met steenmeel significant lager met gemiddeld 37% tegen 48% in de controle (figuur 4.2.4). In het

grotere steenmeel experiment werd in de behandeling met Soilfeed juist een hogere basenverzadiging gemeten in de winter van 2021/2022 (gegevens Onderzoekcentrum B-WARE). In de winter van 2019/2020 werden geen effecten van steenmeel gemeten op de beschikbare Ca-, Mg- of K-concentraties in de bodem. In de zomer van 2021 werden enkele significante effecten van steenmeeltoediening gemeten in de F+OH-laag van beide gebieden. In het Mastbos werd met toediening van steenmeel een significant hogere Ca-beschikbaarheid gemeten van gemiddeld 5195 tegen 4639 $\mu\text{mol/l}$ in de controle. In de Veluwe werd in de behandeling met steenmeel in de F+OH-laag een lagere beschikbare Mg-concentratie gemeten van gemiddeld 1711 tegen 2316 $\mu\text{mol/l}$ in de controle (bijlage 3). Met het toedienen van steenmeel nam de beschikbare aluminiumconcentratie in de F+OH-laag significant toe (van gemiddeld 34 naar 380 $\mu\text{mol/l}$ in het Mastbos en 131 naar 947 $\mu\text{mol/l}$ in de Veluwe). Maar de verhouding van aluminium ten opzichte van calcium was in alle behandelingen zeer gunstig ($<2 \text{ mol/mol}$). Er werden geen effecten van steenmeel gemeten op de beschikbare Ca-, Mg- en K-concentraties in de minerale bodemlaag (bijlage 3). Ook werden er geen effecten van steenmeeltoediening gemeten op de beschikbare aluminiumconcentratie in de minerale bodem of op de Al/Ca-ratio. De Al/Ca-ratio was over het algemeen gunstig met ratio's van 1,3 tot 1,8 mol/mol.



Figuur 4.2.3. pH-water in de zomer van 2021 per behandeling. C=controle, P=P-toediening, S=steenmeeltoediening. Verschil in kleur geeft behandeling met steenmeel weer en arcering geeft P-behandeling weer. Gemiddelde $\pm$ st.fout, verschillende letters geven significant verschil t.o.v. controle weer ($p < 0,05$).

Figure 4.2.3. pH measured in a demi water extract in the summer of 2021 per treatment. C=control, P=P-addition and S=rock powder addition. Addition of rock powder represented with lighter colours and addition of P represented in stripes. Average $\pm$ standard error, different letters represent significant difference with control ($p < 0,05$).

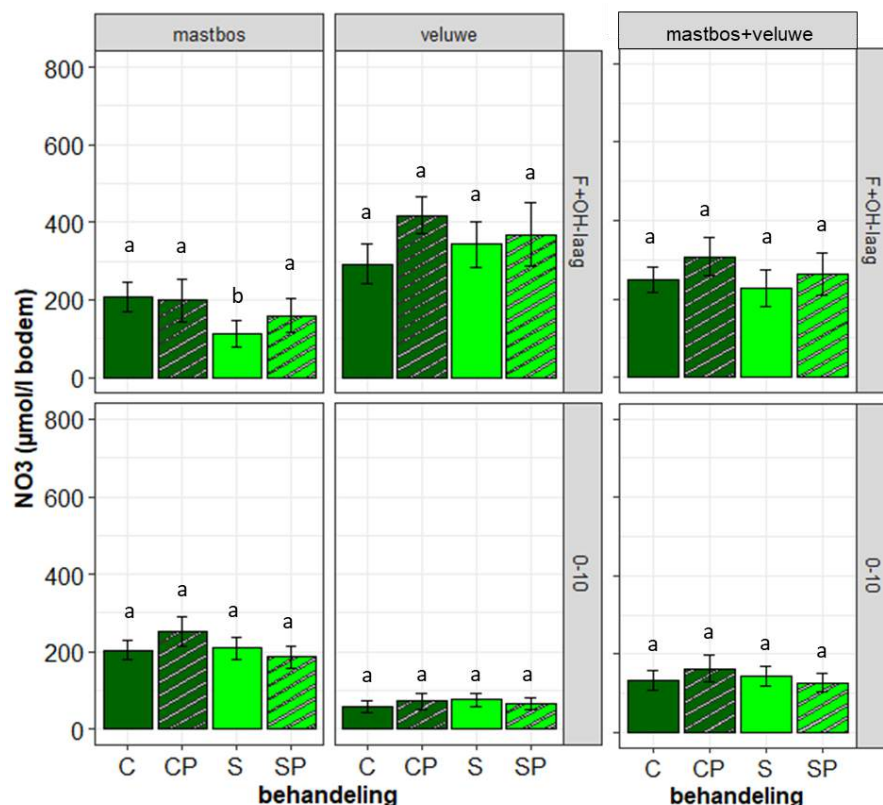


Figuur 4.2.4. Basenverzadiging in percentage (gemeten in een strontiumextract) in de zomer van 2021 per behandeling. C=controle, P=P-toediening, S=steenmeeltoediening. Verschil in kleur geeft behandeling met steenmeel weer en arcering geeft P-behandeling weer. Gemiddelde $\pm$ st.fout, verschillende letters geven significant verschil t.o.v. controle weer ($p < 0,05$).

Figure 4.2.4. Base saturation (%) measured in SrCl_2 -extract in the summer of 2021 per treatment. C=control, P=P-addition and S=rock powder addition. Addition of rock powder represented with lighter colours and addition of P represented in stripes. Average $\pm$ standard error, different letters represent significant difference with control ($p < 0,05$).

Effect van de behandelingen op de N-gehalten en de verhouding tussen N en P in de bodem

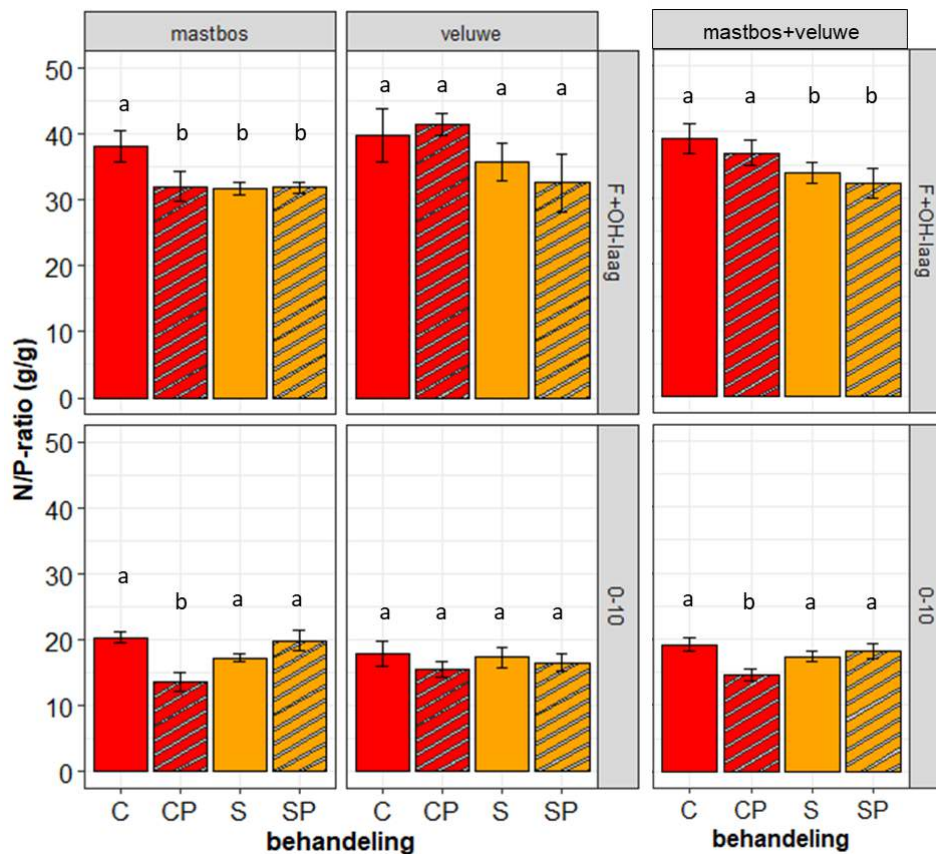
Het toedienen van P resulteerde in de winter van 2019/2020 tot een lagere NO_3 -concentratie in de F+OH-laag en lagere NH_4 -concentratie in de minerale bodemlaag van de Veluwe. Ook werd in de winter van 2019/2020 in de gecombineerde behandeling van steenmeel en P een significant hogere NH_4 -concentratie in de F+OH-laag van de Veluwe gemeten (Bloem et al., 2020). In de zomer van 2021 werden geen effecten van P gemeten op de stikstofconcentraties in de bodem, maar wel effecten van steenmeeltoediening. In het Mastbos werd met steenmeeltoediening een significant lagere NO_3 -concentratie gemeten in de F+OH-laag ten opzichte van de controle (gemiddeld 113 tegen 207 $\mu\text{mol/l}$ bodem) (figuur 4.2.5). Daarnaast werd in de minerale bodem van het Mastbos een significant effect gemeten in de controle behandeling met enten van bodemfauna. In deze behandeling was de NH_4 -concentratie significant hoger ten opzichte van de onbehandelde controle (gemiddeld 136 tegen 32 $\mu\text{mol/l}$ bodem), over het algemeen zijn dit lage concentraties NH_4 .



Figuur 4.2.5. NO_3 -concentratie in $\mu\text{mol/l}$ bodem gemeten in de zomer van 2021 per behandeling. C=controle, P=P-toediening, S=steenmeeltoediening. Verschil in kleur geeft behandeling met steenmeel weer en arcering geeft P-behandeling weer. Gemiddelde $\pm$ st.fout, verschillende letters geven significant verschil t.o.v. controle weer ($p < 0,05$).

Figure 4.2.5. NO_3 -concentration in $\mu\text{mol/l}$ soil measured in a demiwaterextract in the summer of 2021 per treatment. C=control, P=P-addition and S=rock powder addition. Addition of rock powder represented with lighter colours and addition of P represented with stripes. Average $\pm$ standard error, different letters represent significant difference with control ($p < 0,05$).

Met de toediening van P, enten van bodemfauna en de gecombineerde behandeling van P en bodemfauna werd in de zomer van 2021 een significant hoger totaal-N gehalte gemeten in de F+OH-laag van de Veluwe ten opzichte van de controle. Daarnaast werden effecten gemeten op de N/P-ratio in de bodem. In het Mastbos werd een significant effect van P-toediening gemeten op de N/P-ratio in de F+OH-laag en minerale bodemlaag in de zomer van 2021. De N/P-ratio was significant lager in de behandeling met P, met gemiddeld 32 tegen 38 g/g in de F+OH-laag en 14 tegen 20 g/g in de minerale bodemlaag (figuur 4.2.6). Hetzelfde beeld was zichtbaar in de minerale bodem wanneer beide gebieden samen getoetst werden. In de gecombineerde behandeling van steenmeel met P werd dit effect in de minerale bodem niet gemeten. In de minerale bodemlaag van de Veluwe werd een lagere N/P-ratio gemeten in de behandeling met enten van bodemfauna (gemiddeld 15 tegen 21 g/g in de controle). Ook werd in de F+OH-laag in het Mastbos een significant effect van steenmeeltoediening gemeten op de N/P-ratio, deze was gemiddeld lager met steenmeeltoediening (32 tegen 38 g/g). Ook als de twee gebieden samen werden getoetst was de N/P-ratio significant lager met steenmeeltoediening.



Figuur 4.2.6. N/P-ratio in g/g in de zomer van 2021 per behandeling. C=controle, P=P-toediening, S=steenmeeltoediening. Verschil in kleur geeft behandeling met steenmeel weer en arcering geeft P-behandeling weer. Gemiddelde $\pm$ st.fout, verschillende letters geven significant verschil t.o.v. controle weer ($p < 0,05$).

Figure 4.2.6. N/P-ratio in g/g measured in the summer of 2021 per treatment. C=control, P=P-addition and S=rock powder addition. Addition of rock powder represented with lighter colours and addition of P represented in stripes. Average $\pm$ standard error, different letters represent significant difference with control ($p < 0,05$).

Conclusies bodemchemie factoriële proeven

Effect van de behandelingen op het opheffen van P-limitatie

- De eenmalige P-gift werd in de winter van 2019/2020 duidelijk terug gemeten in de bodem. In de zomer van 2021 werd enkel in de minerale bodemlaag nog een hogere P-concentratie gemeten;
- Met steenmeeltoediening werd een lagere P-concentratie in de F+OH-laag gemeten;
- Met het toedienen van bodemfauna en P werd enkel in het Mastbos een hogere P-concentratie gemeten dan in de enkel P-behandeling.

Effect van de behandelingen op het verbeteren van de bodembuffering

- Met steenmeeltoediening werd een duidelijk effect op de pH-water gemeten, deze nam in beide bodemlagen toe;
- In de winter van 2019/2020 werd een hogere basenverzadiging gemeten met toediening van steenmeel. In de zomer van 2021 werd geen verschil gemeten in basenverzadiging, enkel een lagere basenverzadiging in de F+OH-laag. In de winter van 2021/2022 werd geen lagere basenverzadiging in de F+OH-laag gemeten.

Effect van de behandelingen op de N-gehaltes en de verhouding tussen N en P in de bodem

- Het toedienen van P en/of steenmeel resulteerde in lagere NO₃-concentraties in de F+OH-laag, maar totaal-N was hoger met toediening van P of bodemfauna;
- De NH₄-concentratie was in de behandeling met P in de winter van 2019/2020 lager in de minerale bodemlaag van de Veluwe, maar hoger in de F+OH-laag gecombineerd met steenmeel;
- De N/P-ratio was lager met toediening van P (minerale bodemlaag) of steenmeel (F+OH-laag).

4.3 Microarthropoden

De microarthropoden werden vijf jaar na de steenmeelbehandeling (2016) en ruim twee jaar na de behandeling met fosfor en het enten van fauna bemonsterd in eind mei 2021. Drie jaar eerder, in het najaar van 2018 en 2.5 jaar na de steenmeelbehandeling werden geen verschillen tussen de locaties en tussen de steenmeelbehandelingen (Soilfeed en Eifelgold) gevonden voor de springstaarten (Collembola) en mosmijten (Oribatida) (de Vries et al., 2019). Bij onze bemonstering in mei 2021 was aantal microarthropoden op de Veluwe 60% hoger dan in het Mastbos, zowel in het strooisel (ecto-organische laag) als de bodem (minerale laag, 0-10 cm, figuur 4.3.1). In de organische laag waren de dichtheden 10 maal zo hoog als in de minerale bodem daaronder. De behandelingen met steenmeel, fosfor en fauna hadden geen significant effect op de totale aantallen microarthropoden. Maar in de figuur zien we wel lagere aantallen met steenmeel in de bodem van het Mastbos. Wanneer we onderscheid maken tussen de Collembola (springstaarten) en de Acari (mijten), die apart werden geteld onder de microscoop, vinden we wel significante verschillen. In zowel Mastbos als Veluwe was het aantal Collembola in de strooisellaag hoger met steenmeel, terwijl het aantal Acari lager was in de bodem (figuur 4.3.2). De effecten waren wel een trend ($P \leq 0.1$) wanneer de locaties apart werden getoetst, maar niet significant ($P \leq 0.05$). Door de data van beide locaties te combineren verdubbelt het aantal herhalingen per behandeling van 12 naar 24 en wordt het onderscheidend vermogen verhoogd. Dan zijn de effecten van steenmeel wel significant. Door de toename van Collembola in het strooisel en de afname van Acari in de bodem was de Acari/Collembola verhouding in beide lagen significant lager met steenmeel (figuur 4.3.3).

De behandelingen hadden geen effect op het aantal microarthropoden taxa en de Shannon diversiteitsindex (figuur 4.3.4). De alfa diversiteit geeft het aantal aanwezige taxa, de Shannon index omvat ook de verdeling van de relatieve hoeveelheden. Het aantal taxa was in het strooisel ongeveer 3x zo hoog als in de bodem.

De samenstelling van de microarthropoden gemeenschap vertoonde duidelijke verschillen tussen het Mastbos en de Veluwe. Figuur 4.3.5 toont meest voorkomende families gerangschikt op relatieve hoeveelheden (percentage van het totaal) zoals bepaald met DNA metabarcoding. Het Venn diagram (figuur 4.3.6) toont de overeenkomsten en verschillen in het voorkomen van taxa op het niveau van families, genera en species, en de onderscheidende taxa. De meeste taxa komen op beide locaties voor, maar de Veluwe heeft meer onderscheidende taxa.

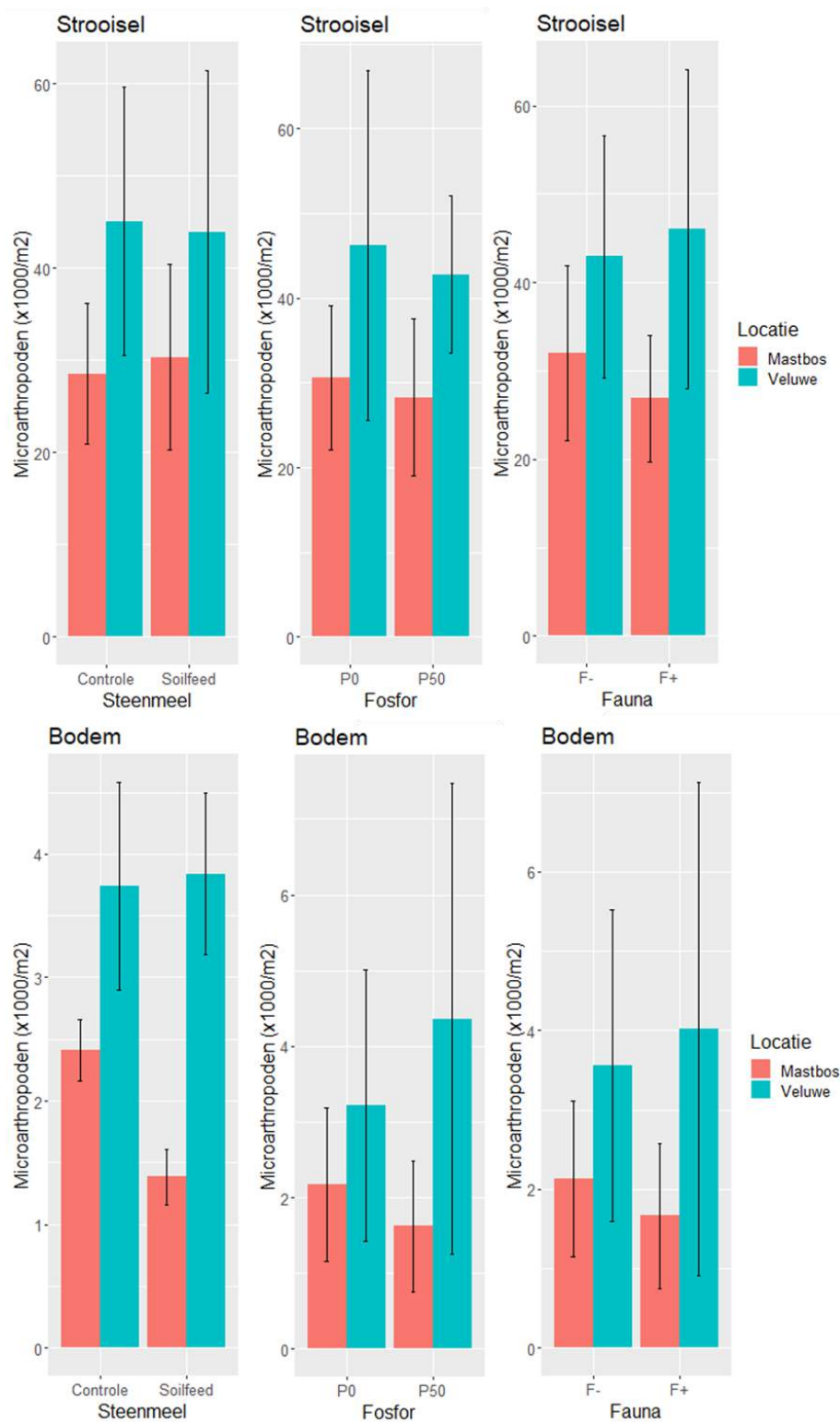
Zowel de locatie, de bodemlaag als de steenmeelbehandeling hadden effect op de samenstelling van de microarthropoden gemeenschap in termen van aanwezigheid en relatieve abundanties van de taxa. Resultaten van principale componenten analyses (PCA) in bijlage 4 tonen de ordening van de proefveldjes (24 Mastbos en 24 Veluwe).

De steenmeel behandeling had effect op het voorkomen van taxa, met het meeste onderscheid op het diepste fylogenetische niveau, de soorten (species) (figuur 4.3.7). Negen soorten kwamen alleen in onbehandelde veldjes voor en 6 waren onderscheidend voor de met steenmeel behandelde veldjes.

De relatieve abundanties van de voedselgilden verschilden niet significant tussen de acht behandelingen van de factoriële proeven (figuur 4.3.8). Dit zijn alle combinaties van de drie

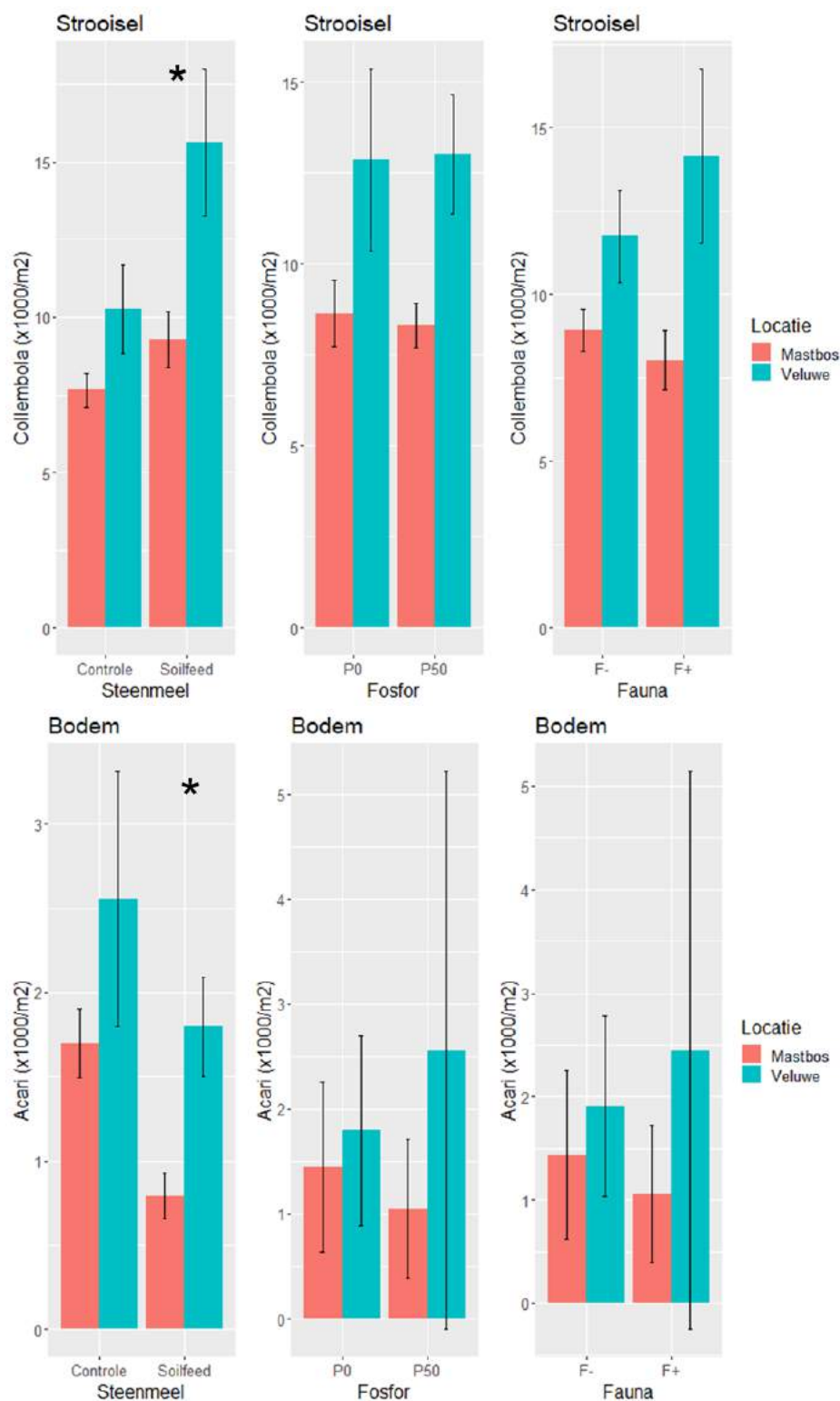
factoren steenmeel (S, versus controle C), fosfor (P versus 0) en fauna (F versus 0), weergegeven door de combinatie van 3 letters, waarbij 0 staat voor geen toevoeging van P en F. Er waren geen hoofdeffecten van fosfor en fauna, maar wel van steenmeel. Met soilfeed waren in de strooisellaag de percentages verhoogd van de fungivore browsers ($P=0.020$) en fungivore grazers ($P=0.029$), terwijl het percentage omnivoren lager was ($P=0.019$). In de minerale bodem was met steenmeel het percentage fungivore browsers significant hoger ($P=0.009$). De toename van de fungivore grazers in de strooisellaag bestond grotendeels uit *Oppiella nova* (familie Oppiidae). Dit is een eurytope mijt, een generalist met ongeslachtelijke voortplanting die in zeer uiteenlopende habitats en omstandigheden voorkomt (Seniczak et al., 2019, Siepel et al., 2019). De afname van omnivoren werd gedomineerd door de familie Eupodidae. Deze hebben overlevingsstrategie met een obligate diapauze. Dit is een periode van inactiviteit meestal om slechtere omstandigheden door te komen. Het voorkomen van deze soorten is gebonden aan seizoen dynamiek; ofwel regelmatige wisselingen in een variabel milieu.

Net als in de veldstudie kon met DNA metabarcoding 5% van de taxa niet worden geïdentificeerd en ingedeeld. Dit komt overeen met de verwachting (risico inschatting vooraf onder 2.1).



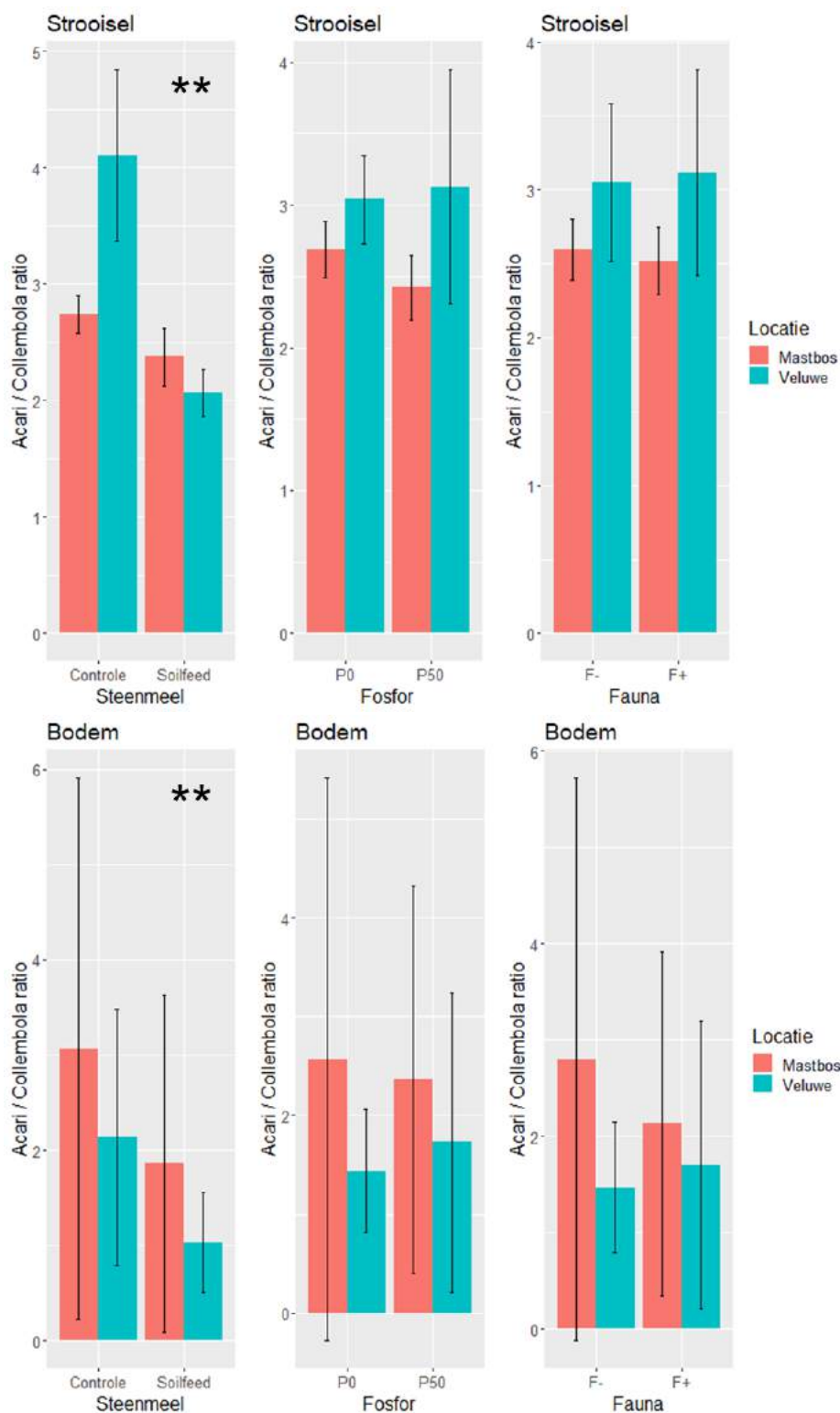
Figuur 4.3.1. Aantal microarthropoden in strooisel en bodem van Mastbos en Veluwe. Geen significant effect van steenmeel, fosfor en fauna. Gemiddelden en standaardfout ($n=12$).

Figure 4.3.1. Total number of microarthropods in litter and soil of Mastbos and Veluwe. No significant effect of phosphorus and fauna. Averages and standard error ($n=12$), ** significance for locations combined.



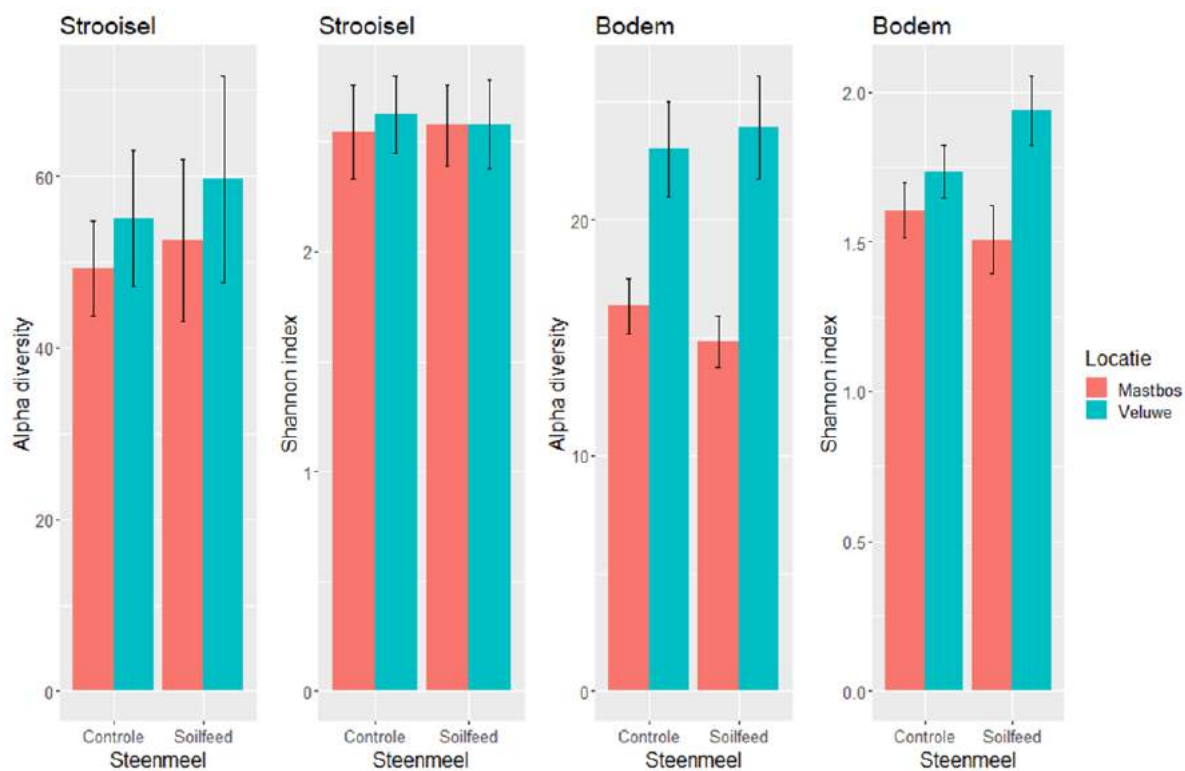
Figuur 4.3.2. Effect van steenmeel op de aantallen Collembola in strooisel ($P=0.032$) en Acari in bodem ($P=0.024$). Geen significant effect van fosfor en fauna. Gemiddelden en standaardfout ($n=12$), *significantie voor de locaties gecombineerd ($n=24$).

Figure 4.3.2. Effect of rock powder on the numbers of Collembola in litter ($P=0.032$) and Acari in soil ($P=0.024$). No significant effect of phosphorus and fauna. Averages and standard error ($n=12$), * significance for locations combined.

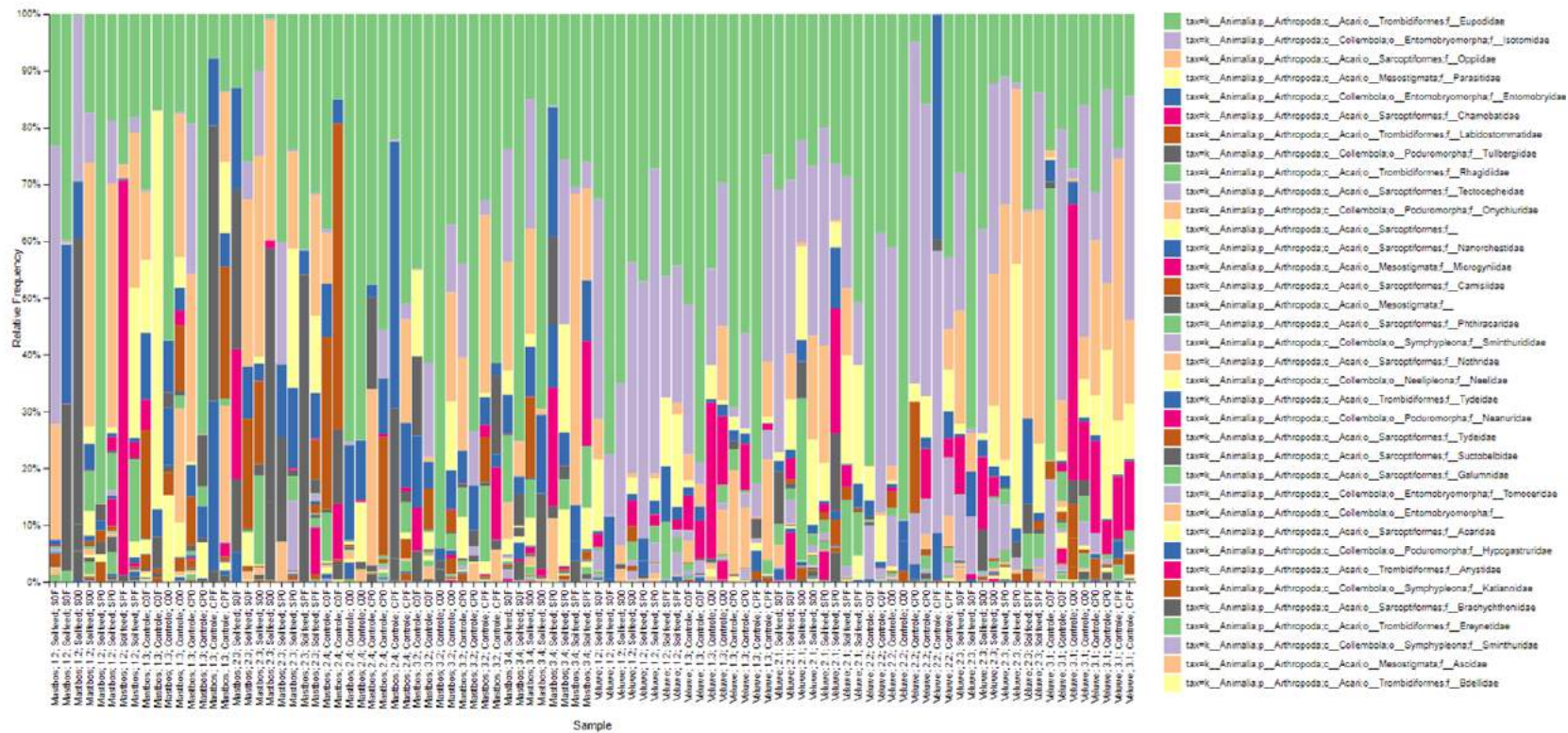


Figuur 4.3.3. Effect van steenmeel op de Acari/Collembola ratio in strooisel ($P=0.004$) en bodem ($P=0.002$). Geen significant effect van fosfor en fauna. Gemiddelden en standaardfout ($n=12$), **significantie voor de locaties gecombineerd ($n=24$).

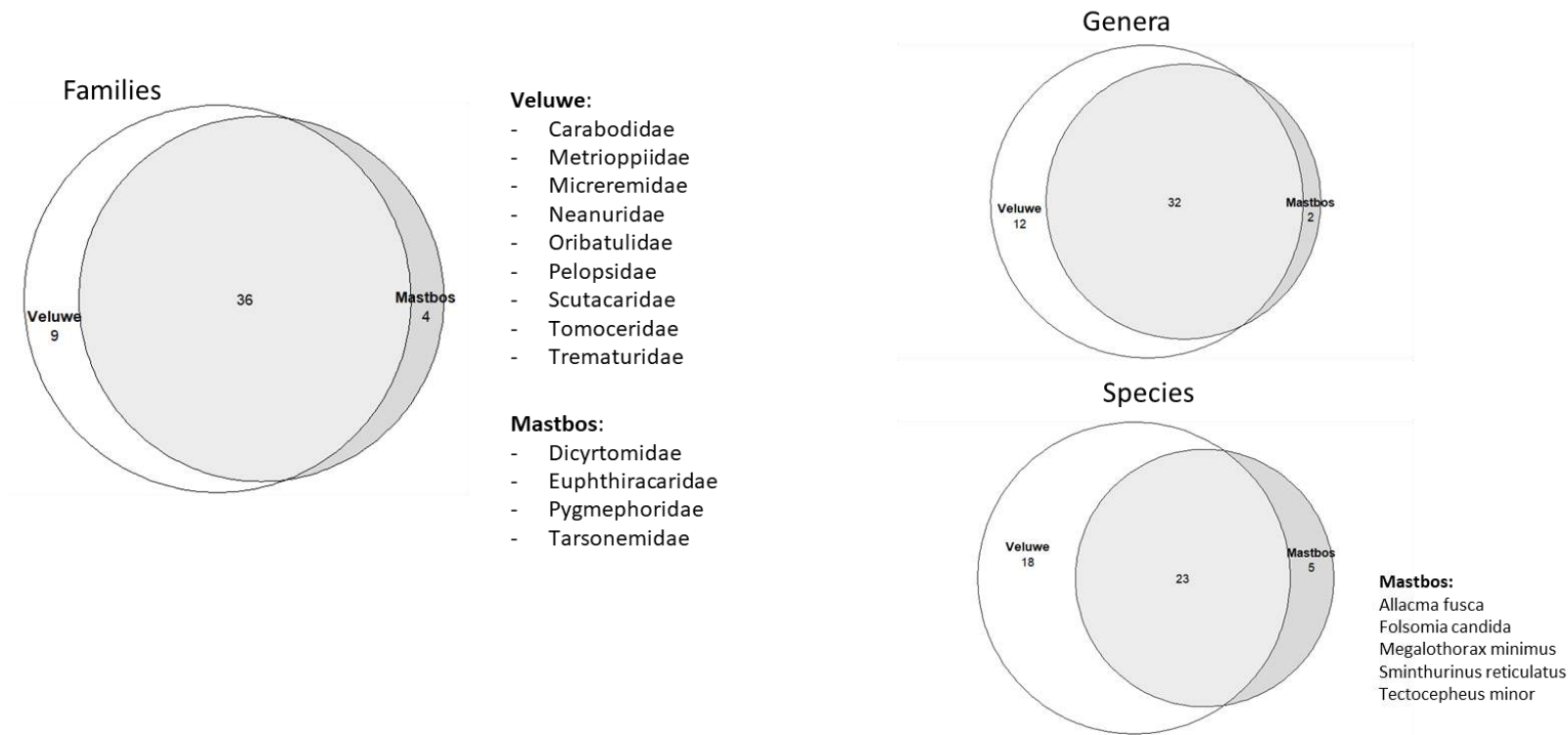
Figure 4.3.3. Effect of rock powder on the Acari/Collembola ratio in litter ($P=0.004$) and soil ($P=0.002$). No significant effect of phosphorus and fauna. Averages and standard error ($n=12$), ** significance for locations combined.



Figuur 4.3.4. Alfa diversiteit en Shannon index van microarthropoden in strooisel en bodem van Mastbos en Veluwe. Geen significant effect van steenmeel. Gemiddelden en standaardfout (n=12).
Figure 4.3.4. Alpha diversity and Shannon index of microarthropods in litter and soil of Mastbos and Veluwe. No significant effect of rock powder. Averages and standard error (n=12).

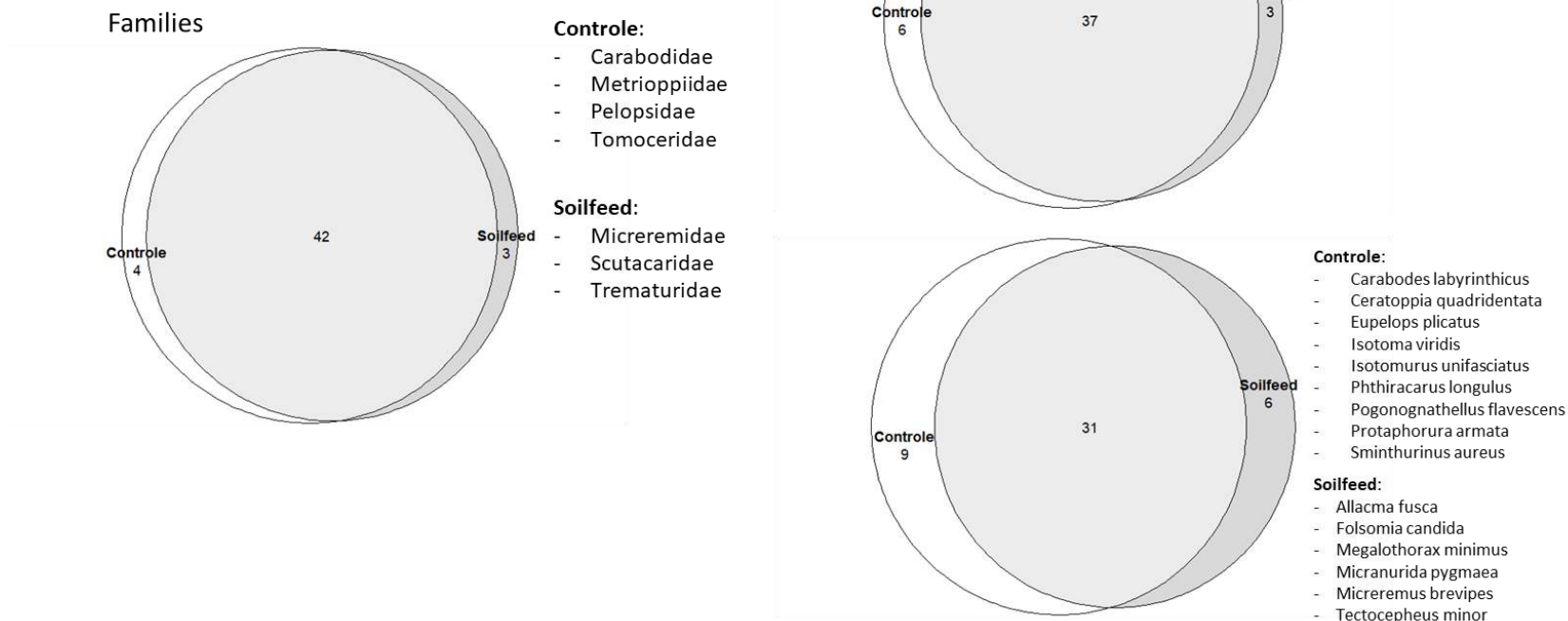


Figuur 4.3.5. De taxa (families) met de hoogste relatieve abundanties in Mastbos (links) en Veluwe (rechts).
Figure 4.3.5. The taxa with highest relative abundances in Mastbos (left) and Veluwe (right).

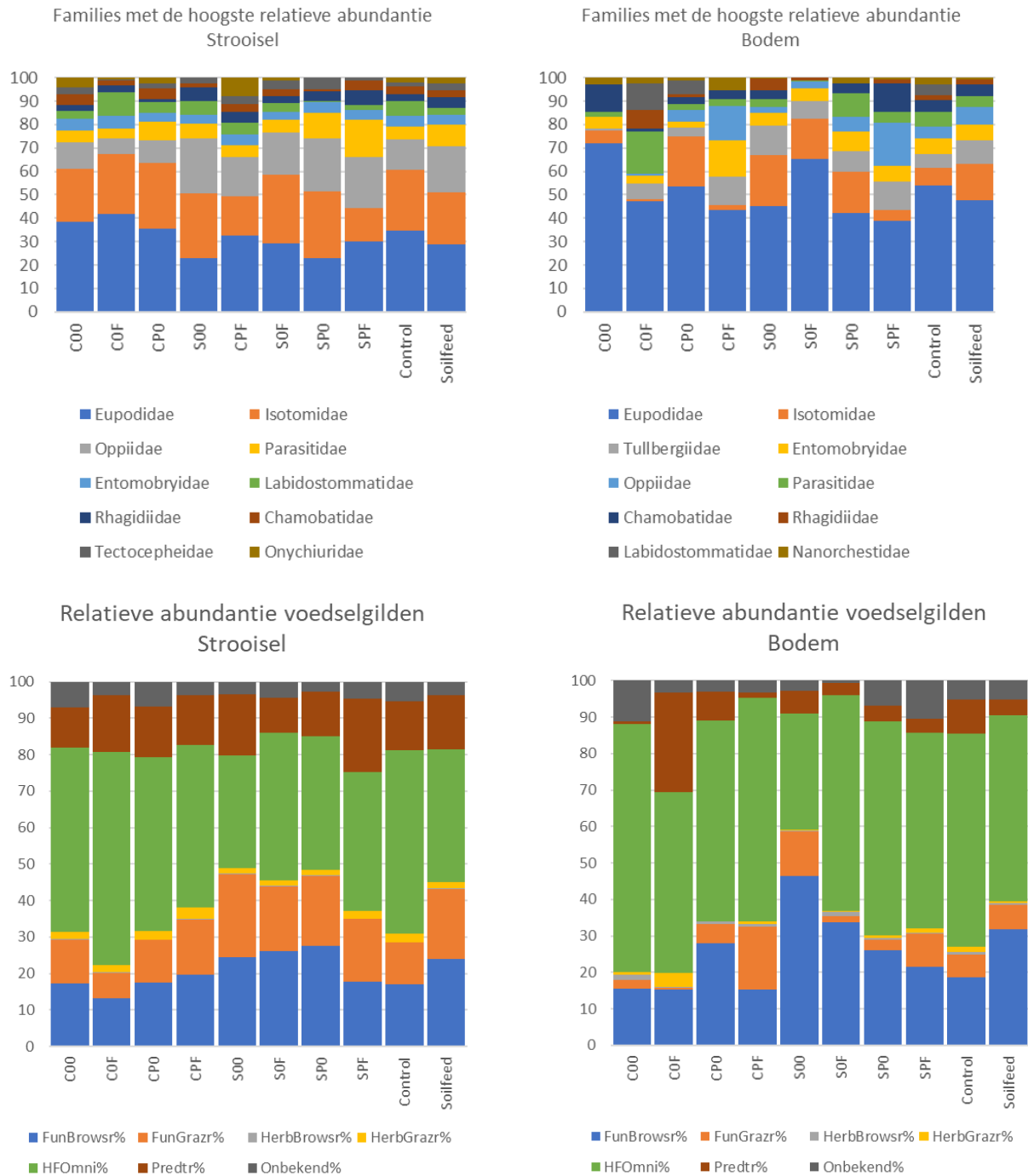


Figuur 4.3.6. Overeenkomsten en verschillen in de aanwezigheid van taxa in Mastbos en Veluwe.

Figure 4.3.6. Similarities and differences in presence of taxa in Mastbos and Veluwe.



Figuur 4.3.7. Overeenkomsten en verschillen in aanwezigheid van taxa zonder (controle) en met steenmeel (soilfeed).
Figure 4.3.7. Similarities and differences in presence of taxa without (control) and with rock powder (soilfeed).



Figuur 4.3.8. Relatieve abundanties (%) van families (boven) en voedselgilden (onder) in strooisel (links) en bodem (rechts) in de verschillende behandelingen, en zonder (controle) en met steenmeel (soilfeed). C is controle, S is steenmeel, P is fosfor, F is Fauna en 0 is geen toevoeging.

Figure 4.3.8. Relative abundances (%) of families (top) and feeding guilds (bottom) in litter (left) and soil (right) in the different treatments, and without (control) and with rock powder (soilfeed). C is control, S is rock powder, P is phosphorus, F is fauna and 0 is no amendment.

Principale componenten analyse (PCA) van de relatieve abundanties van de voedselgilden van de microarthropoden, en de chemische eigenschappen van de strooisellaag van Mastbos en Veluwe, laat zien dat veldjes die behandeld zijn met steenmeel te onderscheiden zijn van veldjes zonder steenmeel (figuur 4.3.9). De pH-water correleerde positief met de fungivore grazers ($R = 0.67$, $P \leq 0.001$) en negatief met de omnivoren ($R = -0.56$, $P \leq 0.001$). De fungivore browsers correleerden negatief met P-zout ($R = -0.50$, $P \leq 0.001$) en NH_4 ($R = -0.48$, $P \leq 0.001$). Er waren geen significante correlaties met (plant beschikbaar) Olsen P.

In de minerale bodem waren er veel minder significante relaties, alleen NH_4 correleerde met de relatieve abundantie van de fungivore grazers ($R = 0.39$, $P \leq 0.01$).

Voor de effecten op de strooiselafbraak gaat het uiteindelijk niet om de relatieve hoeveelheden (percentage) maar om de absolute hoeveelheden microarthropoden van de verschillende voedselgilden. Deze aantallen (per vierkante meter) werden berekend door de relatieve abundantie van elke groep te vermenigvuldigen met het totale aantal microarthropoden.

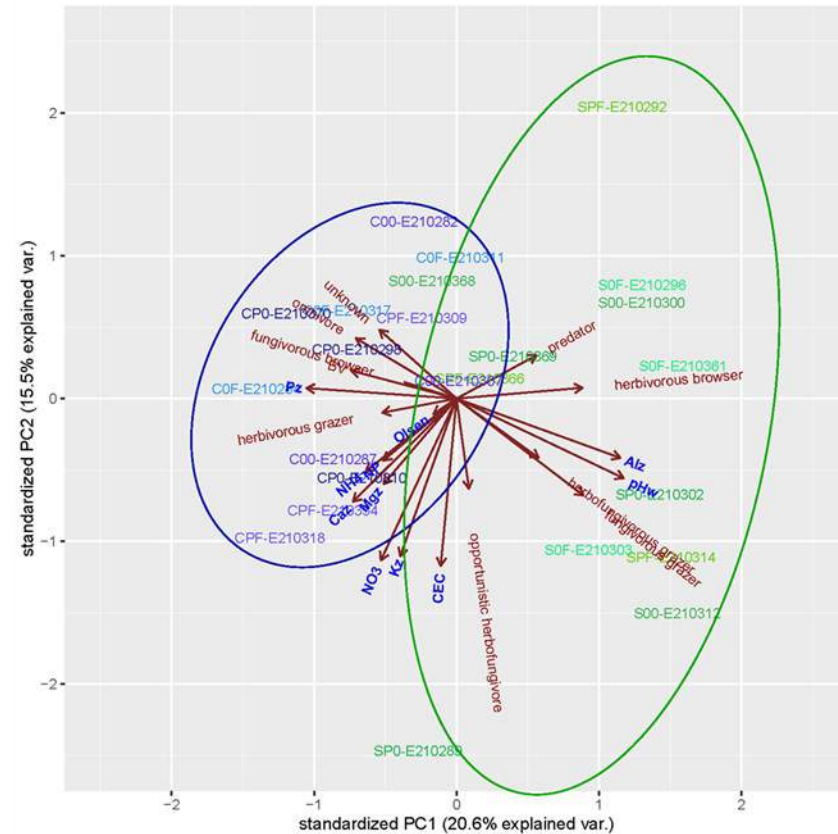
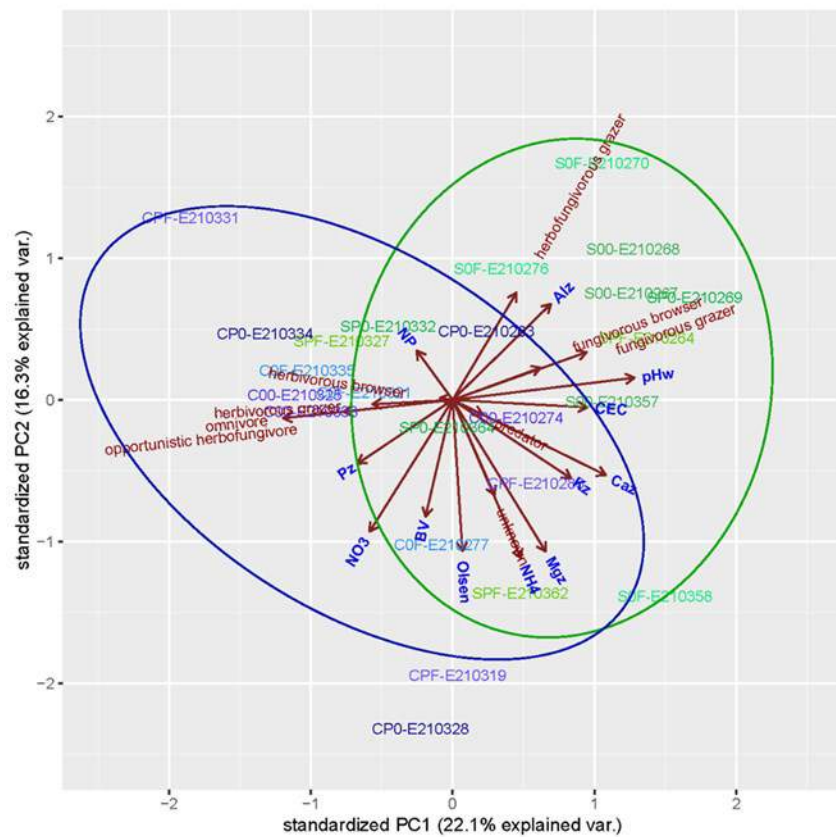
In de strooisellaag waren er de helft meer fungivoren met steenmeel (Fig 4.3.10). Deze toename in aantallen was het meest significant voor de fungivore grazers. Dit zijn alleen Acari. De fungivore browsers (voornamelijk Collembola) waren het sterkst verhoogd met steenmeel op de Veluwe. In de minerale bodemlaag waren de verschillen in aantallen fungivoren niet significant.

De verhoogde aantallen fungivoren in de strooisellaag leidden niet tot hogere aantallen van de totale microarthropoden gemeenschap (figuur 4.3.1) omdat de hoeveelheden omnivoren lager waren ($P = 0.05$).

Net als bij de relatieve abundanties correleerde de pH-water in de strooisellaag positief met de absolute hoeveelheden fungivore grazers ($R = 0.63$, $P \leq 0.001$), maar de negatieve correlatie met de omnivoren ($R = -0.46$, $P = 0.13$) was voor de absolute hoeveelheden niet significant. Verder correleerden de aantallen fungivore browsers negatief met de basenverzadiging ($R = -0.55$, $P \leq 0.01$). Ook waren er geen correlaties met Olsen P. In de minerale bodem waren er helemaal geen significante relaties tussen microarthropoden en chemische eigenschappen.

Het meest significante effect van steenmeel op de microarthropoden was dus de positieve correlatie tussen fungivore grazers en de pH in de strooisellaag. Steenmeel verhoogde de pH-water met 0,4 eenheden, van 4,1 naar 4,5 in het Mastbos, en van 3,9 naar 4,3 op de Veluwe (figuur 4.2.3). Figuur 4.3.11 toont de pH en de hoeveelheden fungivore grazers in alle veldjes zonder ($n = 24$) en met steenmeel ($n = 24$). De vorm van de curve zou te maken kunnen hebben met een hoger aanbod van voedsel (schimmels) bij hogere pH. Rousk et al. (2009) vonden, in een akkerbodem, een maximale groeisnelheid van schimmels bij een pH-water van 4,5, en een sterke afname bij lagere waarden. Of de groeiremming alleen aan de pH ligt is niet vast te stellen, omdat die ook altijd gepaard gaat met veranderingen in beschikbaarheid van toxische metalen, zoals aluminium, en de beschikbaarheid van organische stof. In onze proeven lijkt er geen sprake van aluminium toxiciteit omdat zout oplosbaar aluminium positief correleerde met de pH-water en de fungivore grazers (figuur 4.3.9).

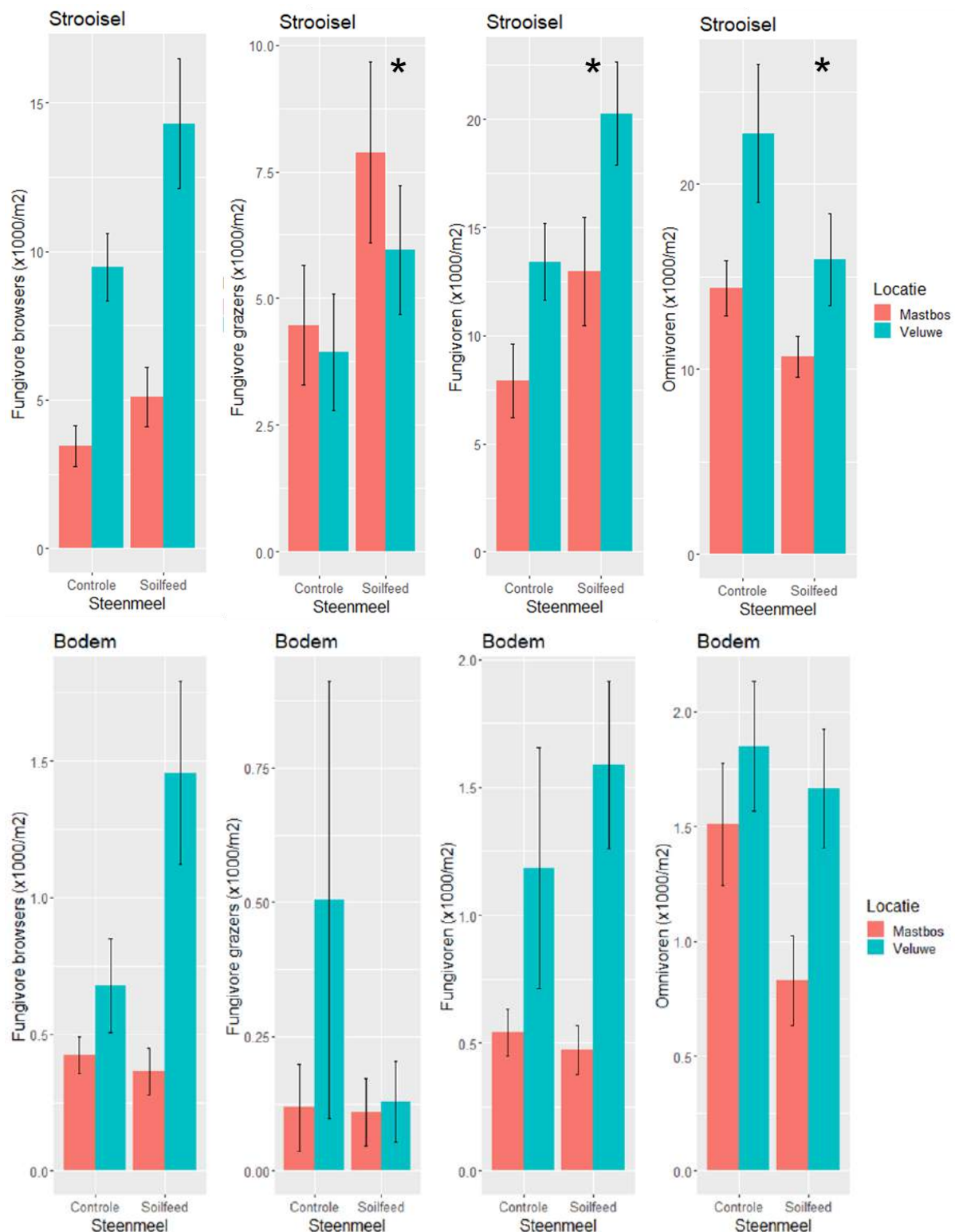
In de minerale bodem was de pH-water de helft minder verhoogd, met 0,2 eenheden van 3,8 naar 4,0 in het Mastbos, en van 4,1 naar 4,3 op de Veluwe, en waren de aantallen een factor 10 lager en de spreiding groter. Dat kan de reden zijn voor het ontbreken van significante relaties tussen de fungivore microarthropoden en de pH-water in de minerale bodem.



A

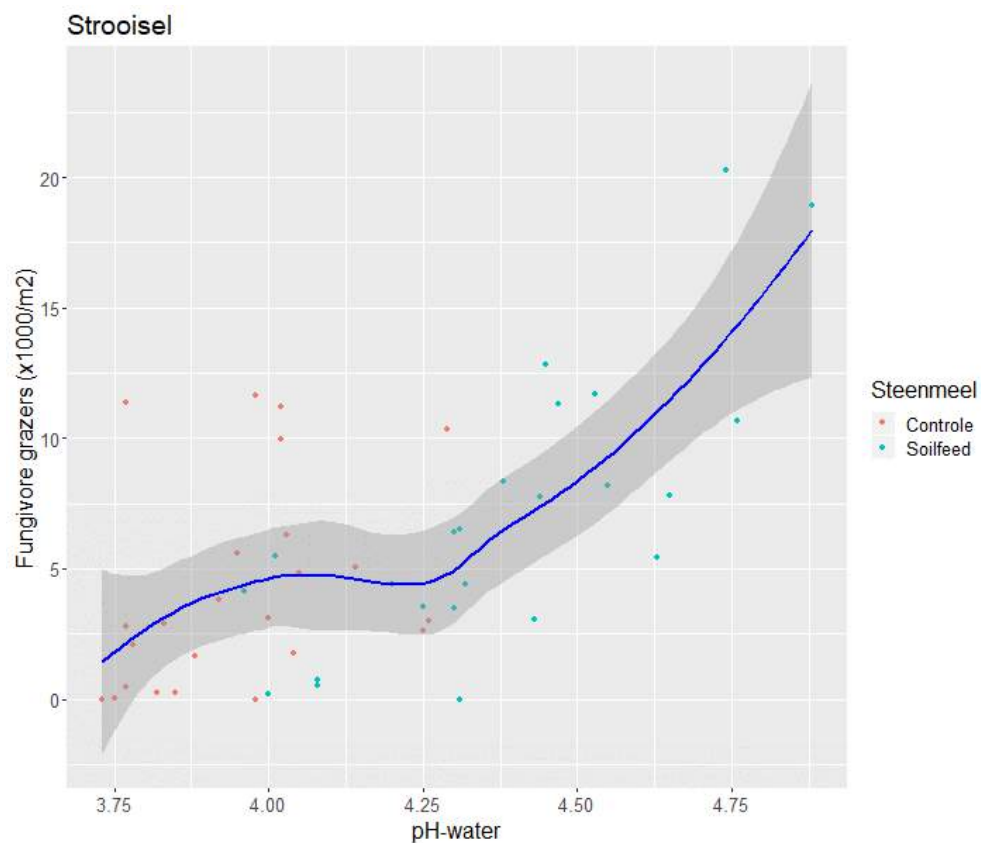
Figuur 4.3.9. Principale componenten analyse (PCA) van de voedselgilden van de microarthropoden en de chemische eigenschappen van de strooisellaag van Mastbos en Veluwe, in de controle zonder steenmeel (blauwe cirkel en codes) en met steenmeel (groene cirkel en codes).

Figure 4.3.9. Principal component analysis (PC) of the microarthropod feeding guilds and chemical properties of the litter layer of Mastbos and Veluwe, in the untreated control (blue circle and codes) and with rock powder (green circle and codes).



Figuur 4.3.10. Effect van steenmeel op de aantallen fungivore browsers ($P=0.103$, n.s.), fungivore grazers ($P=0.035$), fungivoren totaal ($P=0.017$), en omnivoren ($P=0.050$) in de strooisellaag (boven). In de bodem (onder) geen significant effect van steenmeel. Gemiddelden en standaardfout ($n=12$), *significantie voor de locaties gecombineerd ($n=24$).

Figure 4.3.10. Effect of rock powder on abundances of fungivorous browsers ($P=0.103$, n.s.), fungivorous grazers ($P=0.035$), total fungivores ($P=0.017$), and omnivores ($P=0.050$) in the litter layer (top). In the soil layer no significant effect of rock powder. Averages and standard error ($n=12$), * significance for locations combined ($n=24$).



Figuur 4.3.11. Relatie tussen fungivore grazers en pH-water in de strooisellaag van 24 veldjes zonder (controle) en 24 veldjes met steenmeel (soilfeed). De arcering is de standaard fout van de gefitte lijn.

Figure 4.3.11. Relationship between fungivorous grazers and pH-water in the litter layer. The shaded area is the standard error of the fitted line.

Conclusies microarthropoden factoriële proeven

Effect van de behandelingen op het verbeteren van de bodembuffering

- Toename Collembola in strooisel, afname Acari in bodem.
- Daardoor in beide lagen een lagere Acari/Collembola verhouding.
- Geen effect op de diversiteit.
- Wel op de soortensamenstelling en de voedselgilden.
- 50% meer fungivoren.
- 50% meer fungivore grazers.
- Ook meer fungivore browsers in met name Mastbos, maar niet significant.
- Fungivore grazers in de strooisellaag correleerden significant met de pH-water, die was verhoogd met steenmeel.

Effect van de behandelingen op het opheffen van P-limitatie

- Het toedienen van fosfor had geen effect op de aantallen en samenstelling van de microarthropoden gemeenschap. Dit wijst er op dat P niet de beperkende factor is voor de microarthropoden.

Effect van de behandelingen op het opheffen dispersielimitatie

- Het toedienen van strooisel, met daarin bodemfauna van de donorlocaties, had geen effect op de aantallen en samenstelling van de microarthropoden gemeenschap. Dit wijst er op dat de aanwezigheid van taxa niet de meest beperkende factor is.

5. Discussie

Effect van de behandelingen op het opheffen van P-limitatie

De eenmalige P-gift werd in de winter van 2019/2020 duidelijk terug gemeten in de bodem. In de zomer van 2021 werd in de F+OH-laag geen hogere P-concentratie gemeten, maar was de N/P-ratio wel lager met toediening van P. Daarnaast werd met toediening van steenmeel een lagere P-concentratie in de F+OH-laag van de Veluwe gemeten. Desondanks werden er geen effecten van P-toediening op de aantallen en samenstelling van de microarthropoden gemeenschap gemeten. Dit wijst er op dat P niet de beperkende factor is voor de microarthropoden.

Mogelijk is een deel van het fosfaat opgenomen door de vegetatie, het bodemleven of vastgelegd in stabiele vorm in de bodem. Vervolgmetingen kunnen uitwijzen of deze trends zich doorzetten.

P-beperking is wel aangetoond na het plaggen van heide om een nutriëntenoverschot af te voeren, en na het bekalken van bos om verzuring tegen te gaan. Plaggen veroorzaakte P-limitatie in een heideveld in het Nationaal Park De Hoge Veluwe (Siepel et al. 2018). In proefveldjes waar P en Ca (Dolokal) waren toegevoegd werden na drie groeizoenen significante hogere aantallen herbivore en predatore microarthropoden geteld. Maar de fungivore browsers waren afgenomen en er waren te weinig fungivore grazers (2.3%) om een effect te kunnen waarnemen. Dat is veel lager dan de relatieve abundantie van 25% fungivore grazers die in ongeplagde heide werd gemeten. Er was dus geen herstel in de richting van een oorspronkelijke heidebodem. P-bemesting is ongunstig voor mycorrhiza schimmels die dan hun functie verliezen. Dat zou ook de beschikbaarheid van voedsel voor fungivoren verminderen.

In een bosopstand met Grove Den op voormalig stuifzand werden 32 jaar na een bekalking de effecten in de bodem onderzocht (Siepel et al., 2019). De pH was verhoogd, en de buffercapaciteit hersteld, evenals de vegetatie onder de bomen. Maar de hogere pH veroorzaakte ook P-limitatie. Dit had geleid tot significante afname van herbivore en herbofungivore microarthropoden, terwijl fungivoren en opportunistische herbofungivoren niet waren beïnvloed. Fungivoren zijn de laatsten die lijden onder P beperking omdat de saprotrofe en mycorrhiza schimmels die ze eten erg effectief zijn in het opnemen van P. Dat is ook de reden dat plantenwortels onder nutriënten arme omstandigheden symbiosen vormen met mycorrhiza schimmels. In het Mastbos en de Veluwe kwamen nauwelijks herbivoren voor en werd de microarthropoden gemeenschap gedomineerd door omnivoren en fungivoren (figuur 4.3.8). De fungivoren, met name de fungivore grazers zijn het meest effectief in het bevorderen van schimmelactiviteit en strooiselafbraak.

Effect van de behandelingen op het opheffen dispersielimitatie

Het toedienen van strooisel, met daarin bodemfauna van de donorlocaties, had geen effect op de aantallen en samenstelling van de microarthropoden gemeenschap. Dit wijst er op dat de aanwezigheid van taxa en voedselgilden niet de beperkende factor is. De donor locatie voor de Veluwe, het Otterlose bos werd geanalyseerd in het veldonderzoek. Drie taxa van het Otterlose bos strooisel kwamen niet voor in de Veluwe controle maar wel in de Veluwe veldjes met toegevoegd strooisel van het Otterlose bos. Deze 3 soorten (linksboven in het Venn diagram in bijlage 5) zijn mogelijk overgebracht met het donor strooisel. Deze referentie locatie had in de zomer van 2019 in de strooisellaag dichtheden van 86, 52, **36** en **5** x1000/m² van respectievelijk totaal microarthropoden, totaal fungivoren, **fungivore grazers** en **omnivoren**. Deze waren 45, 14, **4** en **23** x1000/m² op de Veluwe (zonder steenmeel) in de zomer van 2021. De referentie locatie werd dus gekenmerkt door een grotere hoeveelheid fungivoren, veel meer fungivore grazers en veel minder omnivoren dan de Veluwe. Net als in het Mastbos en de Veluwe bestonden de fungivore grazers in het Otterlose bos grotendeels uit *Oppiella nova* (voor relatieve abundanties zie bijlage 5). Deze generalist was dus al aanwezig en was geenszins beperkt in verspreiding.

De totale aantallen microarthropoden in het Mastbos (30.000 m⁻²) en de Veluwe (45.000 m⁻²) gemeten in juni 2021, waren laag vergeleken met het gemiddelde aantal van 109.000 m⁻² in de 10 locaties van de veldstudie in 2019. En ook vergeleken met het gemiddelde aantal van 148.000 m⁻² dat in juni 2000 werd gemeten in de bodem van twintig boslocaties in het kader van de Bodembioologische Indicator in het Landelijk meetnet bodemkwaliteit (Rutgers et al., 2007, 2009). Zes terreinen lagen in Noord-Brabant, zes in Drenthe, drie in Utrecht, drie in Gelderland en de overige in Overijssel en Limburg. Elf terreinen bevatten vrijwel uitsluitend naaldbomen (grove den, Douglas-spar, larix en fijnspar), zeven terreinen een gemengde opstand van loof- en naaldbomen (met Amerikaanse eik, beuk, lijsterbes en jeneverbes), en twee zijn loofbossen (populier, els, eik en beuk). Tenslotte waren de aantallen ook laag vergeleken met 10 heideterreinen in 2004 (135.000 m⁻²), en 10 halfnatuurlijke graslanden op zand in 2004 (120.000 m⁻²).

Het opheffen van dispersiebeperking door het toedienen van maaisel had wel effect op geplagde heide in het Dwingelderveld (Weijters et al., 2020; Radujković 2020; Benetková et al., 2022). Door het verwijderen van de nutriëntenrijke toplaag werden de dichtheden van het bodemleven gereduceerd met een factor 10 of meer. Daarna werd bekalkt en heidemaaisel (bodemleven) toegevoegd. Dit leidde in droge heide tot een verhoging van de pH van 5.5 naar 5.8. Het toedienen van plagsel zorgde voor een toename van de hoeveelheid schimmels, met een hogere schimmel/bacterie-ratio tot gevolg. In niet-bekalkte proefvlakken (controle + verzuring) heeft het toedienen van plagsel geleid tot een hogere dichtheid van mesofauna, en een hogere dichtheid van Oribatide mijten (grotendeel fungivore grazers). Dit wordt geïnterpreteerd als een indicator van een stabiele heide habitat.

Effect van de behandelingen op het verbeteren van de bodembuffering

Met steenmeeltoediening werd een duidelijk effect op de pH-water gemeten, deze nam in beide bodemlagen toe. Ook de basenverzadiging was verhoogd, hoewel in de zomer van 2021 een wat lagere basenverzadiging werd gemeten in de strooisellaag van de Veluwe (in de winter van 2021/2022 werd geen lagere basenverzadiging in de F+OH-laag gemeten). De hoeveelheden microarthropoden correleerden niet met de basenverzadiging en de basische kationen in de factoriële proeven.

In de veldstudie hadden locaties met hogere buffering (met meer basische Mg, Ca en K kationen) in het algemeen een hogere pH, minder oplosbaar (potentieel toxisch) aluminium, en een dunnere strooisellaag. Dit wijst op een snellere (minder geremde) strooiselafbraak. De negatieve relatie tussen strooiseldikte en aantallen fungivore browsers, totaal fungivoren en totaal microarthropoden, suggereert dat deze een rol spelen bij de snellere afbraak. Dat lijkt aannemelijk, maar het is ook opvallend omdat 90% van de aantallen voorkomen in de strooisellaag tegen 10% in de minerale bodem. Dan zou een dunnere strooisellaag ook kunnen leiden tot lagere aantallen (fungivore) microarthropoden per vierkante meter.

Verder was in de veldstudie de hoeveelheid basische kationen positief gecorreleerd met fungivore grazers. Het lijkt aannemelijk dat in zuurdere bodems meer schimmels voorkomen. De afbraak wordt dan meer gedomineerd door schimmels dan door bacteriën omdat bacteriën minder goed tegen zuur kunnen (Rousk et al., 2009, de Jong et al., 2015). Maar bij pH-water waarden onder de 4,5 worden ook de schimmels sterk geremd waardoor de verhoudingen minder voorspelbaar worden. De in de veldstudie onderzochte bodems bleken (net als een groot deel van de Nederlandse bosbodems op zand) zeer sterk verzuurd met een gemiddelde pH(NaCl) in de 0-10 cm laag van 3,0. De bodems onder de Amerikaanse vogelkersen bleken iets minder verzuurd met een gemiddeld pH(NaCl) van 3,2. Ook in de basenverzadiging werd eenzelfde patroon gevonden met een gemiddelde basenverzadiging van 21.6% onder de eiken en 28.3% onder de Amerikaanse vogelkers. Deze lichte verhoging in pH en basen kan in dit zure bereik wel leiden tot een verbetering van de condities voor schimmels met het gevonden resultaat op microarthropoden tot gevolg. In de experimenten lag de pH-water tussen 3,75 en 4,80, en was dus met name in de behandelingen met steenmeel beduidend hoger dan in de 10 veldlocaties.

Met steenmeeltoediening werd een lagere Acari/Collembola verhouding gevonden (figuur 4.3.3). Op de Veluwe was in het strooisel de verhouding tussen mijten en springstaarten gehalveerd van 4 naar 2 omdat de aantallen springstaarten met 50% waren gestegen. In het Mastbos waren de verschillen kleiner (figuur 4.3.2). De toename van Collembola bestaat voor een groot deel uit fungivore browsers die eerder een negatief dan een positief effect hebben op de schimmels en de strooisel afbraak. Dus het is niet zonder meer een gunstige ontwikkeling. Maar wel een aanwijzing dat er meer voedsel (schimmelbiomassa) beschikbaar is voor fungivoren. Dat is wel gunstig voor de strooiselafbraak. De afname van Acari in de bodem is ook niet gunstig, maar het effect op de afbraak zal beperkt zijn omdat het overgrote deel van de microarthropoden in de strooisellaag zit.

Het belangrijkste effect van steenmeel voor de microarthropoden was de verhoging van de pH-water, die het sterkst was in de strooisellaag. De hiermee correlerende (50%) toename van fungivore grazers wijst op een hogere groei en afbraakactiviteit van schimmels door de verhoogde pH-water. Hierdoor zou er meer voedsel beschikbaar zijn voor fungivoren, zowel browsers als grazers. Waar de prikkende en zuigende browsers het voorzien hebben op de celinhoud van levende schimmeldraden en daarmee een negatief effect hebben, zorgt de begrazing door fungivore grazers (oribatide mijten, met name *Oppiella nova*) voor een volledige recycling van levende en dode schimmelbiomassa inclusief celwanden, en alle nutriënten die daarin zitten. Dit stimuleert de groei en afbraakactiviteit van schimmels en bacteriën, de nutriëntenbeschikbaarheid voor planten, en de nutriëntenkringloop in het algemeen, inclusief nitrificatie.

Ondanks de 50% verhoging van fungivoren en fungivore grazers, en mogelijk een significante stimulering van de strooiselafbraak, was er geen effect op de totale hoeveelheden microarthropoden omdat de omnivoren juist afnamen. Daardoor gaat de gemeenschap wel meer lijken op een referentielocatie als het Otterlose bos, maar het effect lijkt nog wel vrij bescheiden te zijn.

6. Conclusies en aanbevelingen voor beheer

Het onderzoek beoogt antwoord te geven op de volgende vragen:

kan de microarthropoden gemeenschap worden bevorderd door

- (1) toevoeging van extra P voor opheffing P-limitatie?
- (2) toevoeging van bodemfauna met donorstrooisel voor opheffing van de dispersiebelemmering?
- (3) toevoeging van steenmeel, waarmee meer sporenelementen en basische kationen beschikbaar komen?

Hiervoor werden twee onderzoeken uitgevoerd. Ten eerste werd in een tiental eikenbossen gezocht naar koppelingen tussen de beschikbaarheid van N, P, leemfractie en buffering van de bodem met de samenstelling van de microarthropoden gemeenschap. Ten tweede werden fosfor en fauna behandelingen toegevoegd aan drie jaar eerder ingezette steenmeelbehandelingen in twee identieke experimenten in eikenbos in het Nationale Park Hoge Veluwe en het Mastbos (Breda). Bodemfauna werd geënt door toediening van strooisel verzameld in nabijgelegen oude bossen, het Otterlose- en Ulvenhoutse bos.

P-limitatie

Uit dit onderzoek kwam duidelijk naar voren dat veranderingen in de P-beschikbaarheid geen effect hadden op de aantallen microarthropoden en de hoeveelheden van de verschillende voedselgilden. Uit de correlatieve veldstudie van de tien eikenbossen kwam geen duidelijke relatie naar voren tussen P-beschikbaarheid en de samenstelling van de microarthropoden gemeenschap. Ook in de experimenten in het Mastbos en op de Veluwe werden geen relaties gevonden met de P-beschikbaarheid, terwijl in beide onderzoeken wel sprake was van een duidelijke gradiënt in P-beschikbaarheid in de bodem. Voor het beheer betekent dit dat er op dit moment geen aanwijzingen zijn dat het toedienen van fosfor effectief is voor het stimuleren van de strooiselafbraak. Daarnaast geven deze resultaten een indicatie dat het toedienen van bufferstoffen in eikenbos, waarbij de P-beschikbaarheid in de bodem lijkt af te nemen, binnen deze onderzoekstermijn niet direct schadelijk is voor de microarthropoden gemeenschap. Kanttekening hierbij is dat het mogelijk is dat de P-limitatie niet werd opgeheven met deze P-gift, of dat de microarthropoden gemeenschap in alle onderzochte terreinen slecht ontwikkeld was. Om een beter inzicht te verkrijgen is het daarom van belang dat er een goed referentiebeeld wordt gevormd van de samenstelling van de microarthropoden gemeenschap en bodemchemie van goed functionerende eikenbossen op zandgronden.

Enten van de bodemfauna

Uit deze studie kwamen geen aanwijzingen dat het toevoegen van strooisel uit een meer natuurlijk oud eikenbos (enten) effect had op de samenstelling van de microarthropoden gemeenschap in de bodem binnen de onderzoekstermijn. In de met strooisel geënte proefvlakken in de Veluwe werden drie soorten aangetroffen die wel in de donor-locatie voorkwamen en niet in de onbehandelde proefvlakken. Dit is een aanwijzing dat er met het enten van strooisel mogelijk soorten zijn geïntroduceerd, maar dit had geen effect op de totale aantallen en de aantallen van de voedselgilden zoals de fungivoren. Voor beheer betekent dit dat het op dit moment niet kansrijk wordt geacht om de strooiselafbraak te stimuleren door het enten met bodemfauna op een intacte bodem met een bestaande strooisellaag. Eerder gerapporteerde positieve effecten werden behaald op locaties die eerst geplagd waren.

Verbeteren van de bodembuffering met steenmeel

Uit de correlatieve studie van de 10 eikenbossen kwam duidelijk naar voren dat een hogere beschikbaarheid van basische kationen in de bodem een positieve relatie vertoonde met de aanwezigheid van fungivore browsers en predatoren in de strooisellaag. Ook werd in de bossen met een betere buffering een dunnere strooisellaag aangetroffen. In de steenmeelproeven kwam naar voren dat in de met steenmeel behandelde proefvlakken een hogere pH-water en een hogere basenverzadiging werd gemeten in het strooisel. Een hogere pH leidde in de organische laag tot 50% meer fungivoren en fungivore grazers. Dit is een aanzienlijk effect en lijkt veelbelovend voor een verhoogde activiteit van schimmels en mogelijk ook bacteriën. Dit kan leiden tot snellere strooiselafbraak en uiteindelijk een hogere beschikbaarheid van nutriënten voor de planten. Uit de experimenten in Mastbos en Veluwe bleek dat de hoeveelheid fungivore grazers in het strooisel duidelijk toenam vanaf een pH van 4,3. Dit is een aanwijzing dat het verhogen van de bodem pH een mogelijk positief effect heeft op de in de bodem aanwezige schimmels.

Toch werden er in de met steenmeel behandelde proefvlakken geen hogere totale aantallen microarthropoden gevonden, omdat de toename van de fungivoren gepaard ging met een afname van het aantal omnivoren. Ook in de referentie Otterlose bos waren met name de fungivore grazers zowel relatief als in absolute dichtheden nog veel talrijker dan in de experimenten op de Veluwe.

Voor beheer betekenen deze resultaten dat het verhogen van de bodem pH in situaties waarbij de pH lager is dan 4,3 waarschijnlijk positieve effecten heeft op het bodemleven. Dit betreft de pH-water, en komt overeen met een pH-zout van 3.3. Uit deze studie en het lopende OBN onderzoek in loofbos met steenmeel blijkt ook dat de bodem pH met een steenmeelgift maar zeer gering toeneemt. Vraag is dan ook of de pH-toename die met steenmeel wordt behaald voldoende is om in de bodem aanwezige belemmering voor het bodemleven op te heffen. Dit pleit voor meer onderzoek naar combinatie-toepassingen waarbij wordt getracht de bodem pH nog wat verder te verhogen dan nu met deze steenmeeltoepassingen wordt gedaan. Momenteel wordt er in dat kader onderzoek gedaan naar het combineren van steenmeel met schelpenkalk in de Ginkel. Het op meer plekken inzetten van dergelijke combinatie-proeven wordt aanbevolen. Wel is het belangrijk bekalkingen en steenmeelgiften in bossen met beleid toe te passen, omdat ook bekend is dat bij een overdosering juist negatieve effecten op het bodemleven worden waargenomen en het risico op verruiging van de ondergroei bestaat. Daarnaast zijn alle nu lopende proeven relatief kortlopend in vergelijking met de levenscyclus van een bos. Er is dan ook grote behoefte aan meer inzicht in drempelwaarden, zowel aan de onderkant (remming van het bodemleven) als aan de bovenkant (overdosering waarbij negatieve effecten optreden) en langere-termijn onderzoeken naar steenmeel en/of bekalking in deze bossen. Het op (kleine schaal) toepassen van bufferherstelmaatregelen waarbij de effecten goed worden gevolgd lijkt daarbij een waardevol middel om meer inzicht te verkrijgen.

7. Literatuur

Benetková, P., van Diggelen, R., Háněl, L., Vicentini, F., Moradi, R., Weijters, M., Bobbink, R., Harris, J.A., Frouz, J., 2022. Soil fauna development during heathland restoration from arable land: Role of soil modification and material transplant. *Ecological Engineering*, 176, art. no. 106531.

Bloem, J., E. Verbaarschot, M. Weijters, J.J. de Jong¹, A.J. de Groot, W.J. Dimmers, R. Bobbink, B. Nyssen en L. van den Berg. 2020. Verbetering strooiselafbraak (OBN 2017-103-DZ). Derde tussenrapport.

Bobbink, R., D. Bal, H.F. van Dobben, A.J.M. Jansen, M. Nijssen, H. Siepel, J.H.J. Schaminée, N.A.C. Smits & W. de Vries, 2012. De effecten van stikstofdepositie op de structuur en het functioneren van ecosystemen. In: *Herstelstrategieën stikstofgevoelige habitats: Ecologische onderbouwing van de Programmatische Aanpak Stikstof (PAS)*. Deel I: Algemene inleiding op herstelstrategieën: beleid, kennis en maatregelen. Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie, Den Haag, pp.41-82.

Bosgroep Zuid Nederland en partners, 2021. Correlatief onderzoek Rijk-strooiselsoorten in Natuurgericht Bosbeheer-Fase 2. 17375180. Bosgroep Zuid Nederland. 78. carbohydrase enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1491-1497.

De Vries, F.T., E. Hoffland, N. Van Eekeren, L. Brussaard and J. Bloem. 2006. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting management. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2092-2103.

De Vries, F.T., J. Bloem, N. van Eekeren, L. Brussaard and E. Hoffland. 2007. Fungal biomass in pastures increases with age and reduced N input. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1620-1630.

De Vries, W., M. Weijters, A. de Jong, R. de Waal, P. Bolhuis, J. Bloem, A. van de Burg, G.J. van Duinen en R. Bobbink. 2017. Herstel loofbossen op droge zandgronden - Doorgaande verzuring van op droge zandgronden onder loofbossen en herstelmogelijkheden door steenmeeltoediening. Tussenrapportage OBN 2015-73-DZ. Wageningen Environmental Research, Wageningen, Mei 2017.

De Vries, W., M.J. Weijters, J.J. de Jong, S.P.J. van Delft, J. Bloem, A. van den Burg, G.A. van Duinen, E. Verbaarschot & R. Bobbink (2019). Verzuring van loofbossen op droge zandgronden en herstelmogelijkheden door steenmeeltoediening. Rapport OBN229-DZ. Vereniging van Bos- en Natuurterreineigenaren (VBNE), Driebergen.

Desie, E., K. Vancampenhout, L. van den Berg, B. Nyssen, M. Weijters, J. den Ouden & B. Muys, 2020. Litter share and clay content determine soil restoration effects of rich litter tree species in forests on acidified sandy soils. *Forest Ecology and Management* 474: 118377.

Haas, J., U.S. Klaassen, L. Akhmetzyanov & J. den Ouden, 2020. Does input of rich litter facilitate tree growth?: growth and climate growth response of oak (*Quercus robur*) growing in the neighborhood of black cherry (*Prunus serotina*). Wageningen University and Research Forest Ecology and Management group. <https://edepot.wur.nl/533278>.

Jong, J.J. de; Bloem, J. ; Delft, S.P.J. van; Hommel, P.W.F.M. ; Oosterbaan, A. ; Waal, R.W. de. 2015. Ecologie van bosbodems : een verkennende studie naar ecologisch functioneren van bosbodems op zandgronden.. Wageningen : Alterra Wageningen UR, (Alterra-rapport 2657) - p. 89.

Kemmers, R, J. Bloem and J. Faber. 2013. Nitrogen retention by soil biota; A key role in the rehabilitation of natural grasslands? *Restoration Ecology* 21: 431-438.

Kemmers, R. P. Brinkman, J. Bloem, J. Faber & W. van der Putten. 2011. Is bodemdiversiteit van belang voor herstel van beekdalvegetaties? *De Levende Natuur* 112, 4-9.

Kemmers, R., 2012. Zijn bodemorganismen van belang voor herstel van verzuurde bossen? *De Levende Natuur* 113, 24-28.

Kemmers, R.H., 2011. Effecten van verzuring op bodemleven en stikstofstromen in bossen. Verkenning van mogelijkheden voor herstelmaatregelen. Alterra-rapport 2204. 43 pp. Wageningen.

Kooijman, A.M., J. Bloem C. Cerli, G.A.J.M. Jagers op Akkerhuis, K. Kalbitz, W. Dimmers, A. Vos, A.K. Peest, R.H. Kemmers. 2014. Stikstofkringloop in kalkrijke en kalkarme duinbodems - en

de implicaties daarvan voor de effectiviteit van plaggen. VBNE, Vereniging van Bos- en Natuurterreineigenaren. Rapport nr. 2014/OBN189-DK, Driebergen.

Long-term effects of liming on soil physico-chemical properties and micro-arthropod communities in Scotch pine forest. *Biology and Fertility of Soils*, 55, 675-683.

Lucassen, E., L. van den Berg, R. Aben, F. Smolders, J. Roelofs en R. Bobbink, 2014b. Bodemverzuring en achteruitgang zomereik. *Landschap* 31 (4): 185-193.

Lucassen, E., R. Aben, A. Smolders, R. Bobbink, J. van Diggelen, M. van Roosmalen, D. Boxman, L. van den Berg & J. Roelofs, 2014a. Bodemverzuring als aanjager van eikensterfte: gevolgen voor herstelmaatregelen. *Vakblad Bos, Natuur en Landschap*, maart 2014, 23-27.

Oosterbaan, A., 2014. Eikensterfte: ernst, oorzaken en beheer. *Vakblad Bos, Natuur en Landschap*, januari 2014, 22-25.

Oosterbaan, A., R. Bobbink en M. Decuyper, 2014. Onderzoek naar de relatie van eikensterfte met droogte en bodemchemie; Alterra-rapport nr. 2575, Wageningen. 29 pp.

Radujković, D., van Diggelen, R., Bobbink, R., Weijters, M., Harris, J., Pawlett, M., Vicca, S., Verbruggen, E., 2020. Initial soil community drives heathland fungal community trajectory over multiple years through altered plant-soil interactions. *New Phytologist*, 225, 2140-2151.

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1589-1596.

Rutgers M., C. Mulder, A.J. Schouten, J. Bloem, J.J. Bogte, A.M. Breure, L. Brussaard, R.G.M. de Goede, J.H. Faber, G.A.J.M. Jagers op Akkerhuis, H. Keidel, G.W. Korthals, F.W. Smeding, C. ten Berg, N. van Eekeren. 2007. Typering van bodemecosystemen in Nederland met tien referenties voor biologische bodemkwaliteit. RIVM rapport 607604008, 96 pp.

Rutgers, M., A.J. Schouten, J. Bloem, N. van Eekeren, R.G.M. de Goede, G.A.J.M. Jagers op Akkerhuis, A. van der Wal, C. Mulder, L. Brussaard, A.M. Breure. 2009. Biological measurements in a nationwide soil monitoring network. *European Journal of Soil Science* 60: 820-832.

Seniczak, A., Seniczak, S., Graczyk, R. et al. Seasonal Dynamics of Oribatid Mites (Acari, Oribatida) in a Bog in Poland. *Wetlands* 39, 853-864 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13157-019-01125-2>

Siepel H, Vogels J, Bobbink R, Bijlsma RJ, Jongejans E, de Waal R & Weijters M (2018) Continuous and cumulative acidification and N deposition induce P limitation of the micro-arthropod soil fauna of mineral-poor dry heathlands. *Soil Biology & Biochemistry* 119, 128-134.

Siepel, H., Bobbink, R., van de Riet, B.P., van den Burg, A.B., Jongejans, E., 2019.

Siepel, H., de Ruiter-Dijkman, E.M., 1993. Feeding guilds of oribatid mites based on

van den Berg, L., B. Nyssen, E. Desie, G. van Duinen, E. Al, M. Weijters, E. Verbaarschot, R. Bobbink & A. van den Burg, 2018. Correlatief onderzoek rijk-strooiselsoorten in natuurgericht bosbeheer-Fase 1. Bosgroep Zuid Nederland. Heeze. 62.

Van den Burg, A., A. Dees, T. Huigens, R.-J. Bijlsma & R. de Waal, 2014. Voedselkwaliteit en biodiversiteit in bossen van de hoge zandgronden. Rapport O+BN nr. 2014/OBN186-DZ.

Van Dobben, H.F., 2011. Lange-termijn effecten van bekalking op bosvegetatie: bruikbaarheid van oude experimenten; Alterra-rapport nr. 2098, Wageningen. 36 pp.

Vogels, J. J., M. Weijters, R. J. Bijlsma, R. W. de Waal, R. Bobbink & H. Siepel 2016. Fosfaattoevoeging Heide. VBNE, Driebergen, 127 pag.

Weijters, M.J., A.U. van der Bij, J.A. Harris, M. Pawlett, W.-J. Emsens, J. Frouz, P. Benetkova, E. Verbruggen, D. Radujkovic, E. Verbaarschot, R. van Klink, R. Vermeulen, R. van Diggelen en R. Bobbink. 2020. Praktijkproef heideontwikkeling op voormalige landbouwgrond in het Noordenveld (Dwingelderveld). Resultaten 2011-2018. Vereniging van Bos- en Natuurterreineigenaren Rapport nr. 2020/OBN233-DZ Driebergen, 2020.

Wubs, E., van der Putten, W., Bosch, M., Bezemer, T.M., 2016. Natuurherstel door grondtransplantatie. *Landschap* 33, 11-14.

Bijlage 1. Veldonderzoek – data analyse chemie en microbiota

Methoden statistiek

Doel van het onderzoek is “Door gebruik te maken van locaties met uiteenlopende bos- en bodemkwaliteit kunnen statistische verbanden tussen de aantallen en biodiversiteit van microarthropoden en de beschikbaarheid van macro- en micronutriënten worden vastgesteld.”

Categorisering sites

Voor de analyse zijn locaties uit een eerder onderzoek geselecteerd en gecategoriseerd op basis van “rijkdom”. Deze categorisering is uitgevoerd aan de hand van bodemchemieparameters van de diepere bodemlagen (omdat daar het effect van de boomsoort minder aanwezig is) zodat het daadwerkelijke een selectie is van rijkere bodems ten opzichte van gematigde en arme bodems. De volgende parameters (onder andere) zijn voor de selectie gebruikt: zand-/silt-/kleigehalte, nutriënten als P en N, buffering als basische kationen en zuurindicatoren als vrij aluminium en vrij ijzer (zoutextracten). Voor een beter inzicht in de relaties tussen parameters zijn deze parameters ook in een correlatiematrix getoond.

Selectie van variabelen voor verder onderzoek.

Gezien het grote aantal variabelen in 0-10 en 20-30 cm bodemlaag en het relatief geringe aantal locaties is het noodzakelijk om het aantal te toetsen variabelen te reduceren tot alleen de belangrijkste variabelen.

Reductie van het aantal variabelen.

Deze reductie van het aantal variabelen werd uitgevoerd aan de hand van de volgende (in deze volgorde) stappen. Allereerst werden hypothesen geformuleerd op basis van ecologisch en biogeochemisch inzicht waarbij de belangrijkste beschikbare milieuparameters voor de betreffende hypothesen werden geselecteerd. In tweede instantie werd een correlatiematrix berekend waarbij de variabelen met een correlatiecoëfficiënt van >0.7 werden gemarkeerd. Vervolgens werd aan de hand van ordinatie (PCA/CCA) op de bodemdata met de niet gecorreleerde variabelen gekeken welke variabelen verschillen tussen locaties verklaren. Op basis van de correlatiematrix en aan de hand van de ecologisch inschattingen werd bepaald welke variabelen meegenomen werden in de vervolganalyse (zie bijlage 1.1).

In onderstaande tabel 1 is weergegeven welke variabelen uiteindelijk na deze data reductiestappen in de vervolganalysen werden meegenomen.

Tabel 1. Selectie van variabelen voor verdere analyse na datareductie (zie bijlage 1.1 voor methoden)

Indicator	variabelen
Zuurgraad	pH, Al (zout)
Buffering	Basenverzadiging (zout), basische kationen (zout) Mn (zout)
Eutrofie	NH ₄ (zout), NO ₃ (zout), P (totaal)
Habitat	Strooiseldikte, Organische stof gehalte, CN OL, OF, OS Silt, Klei

Analyse verklarende variabelen

Het voorkomen van microarthropoden werd (na datareductie, zie tabel 1 en bijlage 1.1) geanalyseerd met een multivariate analyse waarbij de aantallen van functionele groepen en de bodemchemie gegevens na selectie in een RDA werden geanalyseerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van een stepwise selection in RDA waarbij de significant verklarende milieuvariabelen gevisualiseerd werden.

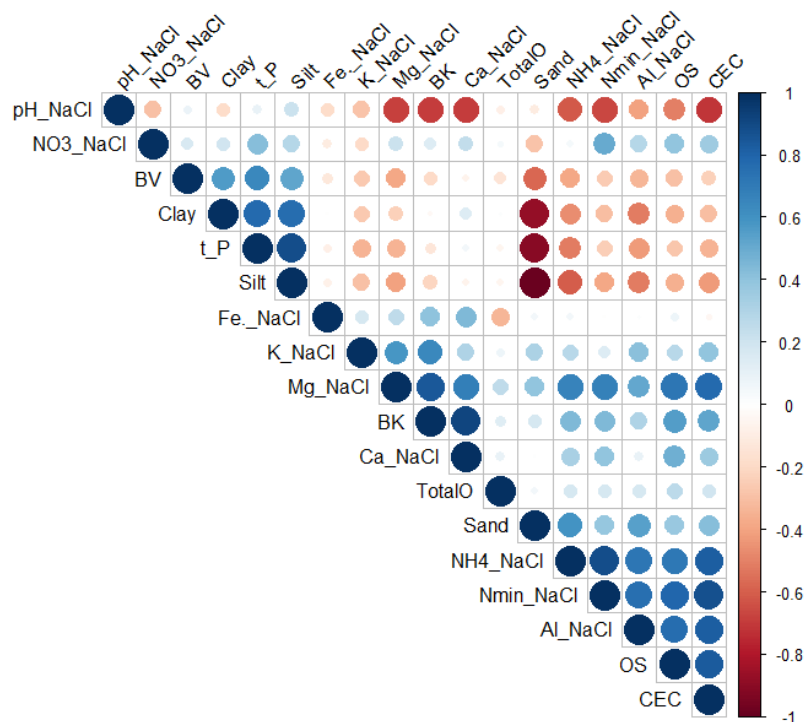
De uit de RDA voortkomende, verklarende variabelen werden geanalyseerd met behulp van mixed modellen om de effectgrootte van de variabelen op het voorkomen van de functionele groepen van microarthropoden weer te geven. Hierbij werd rekening gehouden met het feit dat er 3 monsterpunten per locatie (bos) aanwezig zijn door deze als random effect mee te nemen in de modellen. Hierdoor worden de effectgroottes van de variabelen berekend rekening houdend met de mogelijke verschillen tussen locaties. Effectgroottes geven daarin de invloed van de betreffende parameter op het model.

Resultaten

Categorisering van de sites

Bosgroep Zuid Nederland, B-WARE en KU Leuven hebben in 2 onderzoekprogramma's locaties met Zomereiken en Amerikaanse vogelkersen bemonsterd. Per locatie (bos) zijn 4 sub-replica's (onder 4 verschillende eiken) bemonsterd. Voor de correlatieve veldstudie werd een arm-rijk selectie gemaakt van 10 gerepliceerde locaties uit deze dataset.

Deze selectie is gebaseerd op multivariate analyses van de bodemchemie en fysische parameters als de hoeveelheid silt/zand van alle bemonsterde locaties. Hiervoor werden de elementen uit de zoutextracties gebruikt omdat deze het vrij beschikbare deel representeren. Uitzondering hierop is de hoeveelheid fosfor (P) waarbij de totale hoeveelheid P uit destructie werd gebruikt omdat mycorrhiza en planten vaak meer P kunnen opnemen dan alleen het vrij beschikbare deel. In eerste instantie werd een correlatiematrix gemaakt waarmee inzichtelijk werd gemaakt of bepaalde parameters wel of niet met elkaar gecorreleerd zijn. Onderstaande figuur 1 toont de correlatiematrix. Te zien is dat met name het gehalte silt, zand en klei gecorreleerd zijn: hoe meer klei, hoe minder zand in de fractie. Dat is evident en aangezien we zoeken naar mate van rijkdom laten we deze variabelen, ondanks de hoge mate van correlatie) in de vervolgstap (PCA met milieuvariabelen) behouden.

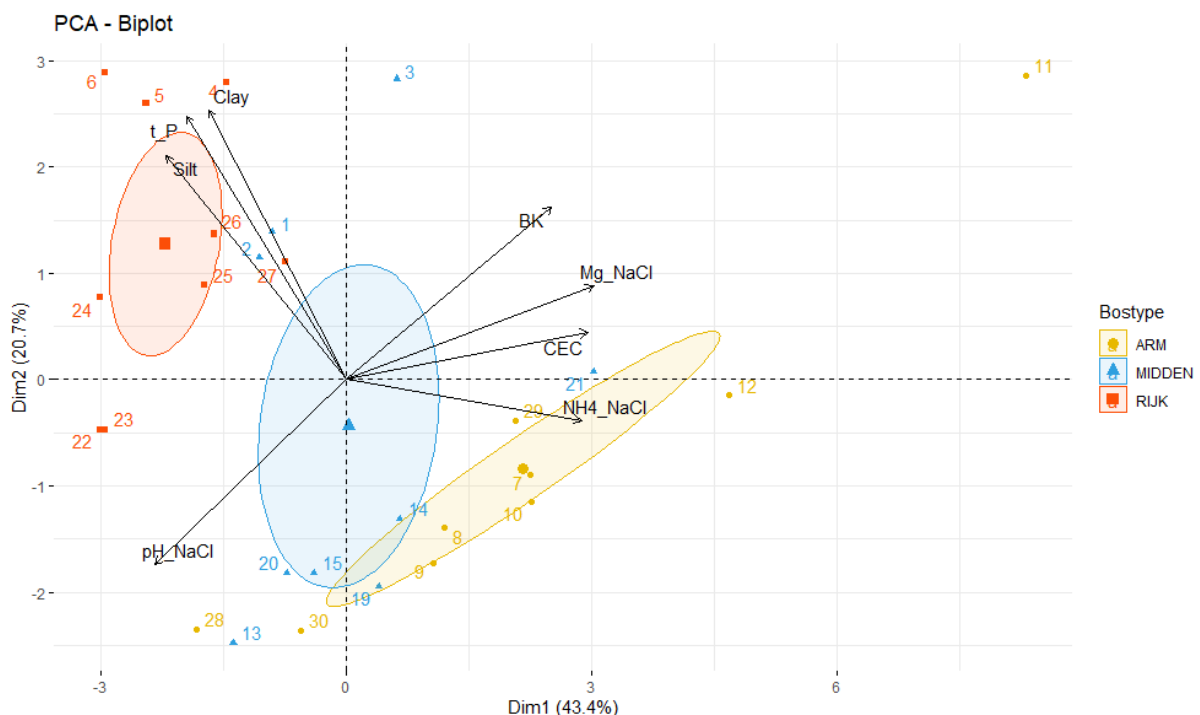


Figuur 1. Correlatiematrix op basis van bodemchemie (20-30cm) zoutextracten en totalen (destructie)

Uit de figuur blijkt dat er het aluminiumgehalte in het zoutextract en de hoeveelheid mineraal N in het zoutextract (= som van NH_4^+ + NO_3^-) positief gecorreleerd zijn. Ook het aluminium gehalte en organische percentage zijn positief gecorreleerd. Mogelijk worden deze relaties getrokken door het organische stof gehalte waarbij hogere gehalten aan organische stof zorgen voor meer bindingsplaatsen voor aluminium en ammonium. Zandfractie is ook sterk negatief gecorreleerd met silt en klei. In de vervolg pca nemen we dus alleen silt en klei mee. Basische kationen is sterk

gecorrleerd met calcium, magnesium en dus kan men volstaan met de variabele “basische kationen” in onderstaande pca.

Figuur 2 toont een multivariate analyse (PCA) voor de bodemchemie (20-30cm onder maaiveld) met daarin variabelen die voedselrijkdom (N, P, klei en silt gehalte) en buffering/zuurgraad karakteriseren (pH, basische kationen, basenverzadiging, ijzer en aluminium). De monsterpunten blijken te verschillen in de hoeveelheid silt en N en P gehalte. De bossen die we kunnen karakteriseren als bossen met een “rijkere” bosbodem zijn duidelijk verschillend van de “midden” categorie” en de “arme categorie”. De “arme” categorie is daarbij ook zuurder dan de “midden” en “rijke” bodems. Enkele monsterlocaties binnen de categorie “arm” lijken wat beter gebufferd (monsterlocatie nr. 28 in onderstaande figuur) maar dit betreft dan 1 van de 3 monsterpunten in een bos, de gemiddelden tonen hier wel degelijk een zuurder en armer bostype dan de bossen uit de categorieën “midden” en “rijk”..



Figuur 2. Categorisering van de boslocaties op basis van PCA met milieuvariabelen uit het zoutextract en de totalen (destructie) voor parameters die karakteriserend zijn voor nutriënten gehalten, zand/klei gehalten, organische stof en mate van buffering/verzuring.

Door de selectie verkrijgen we 30 meetpunten. De selectie en categorisering in klassen van rijkdom voor de uiteindelijke 9 locaties staat in tabel 2. De 10^{de} locatie is het Otterlose bos hetgeen een Natura 2000 referentie is. Zoals te zien is in de PCA verschillen de arme en rijke plots met name in het gehalte aan P en zand-/klei- of siltfractie. Verder zien we dat de arme locaties een variabele pH en basische kationen hebben (ze liggen wat breder verspreid langs deze variabelen) hetgeen niet te voorkomen was in de selectie

Tabel 2. Selectie van 9 locaties voor het veldonderzoek, waarbij per locatie replicaties beschikbaar zijn

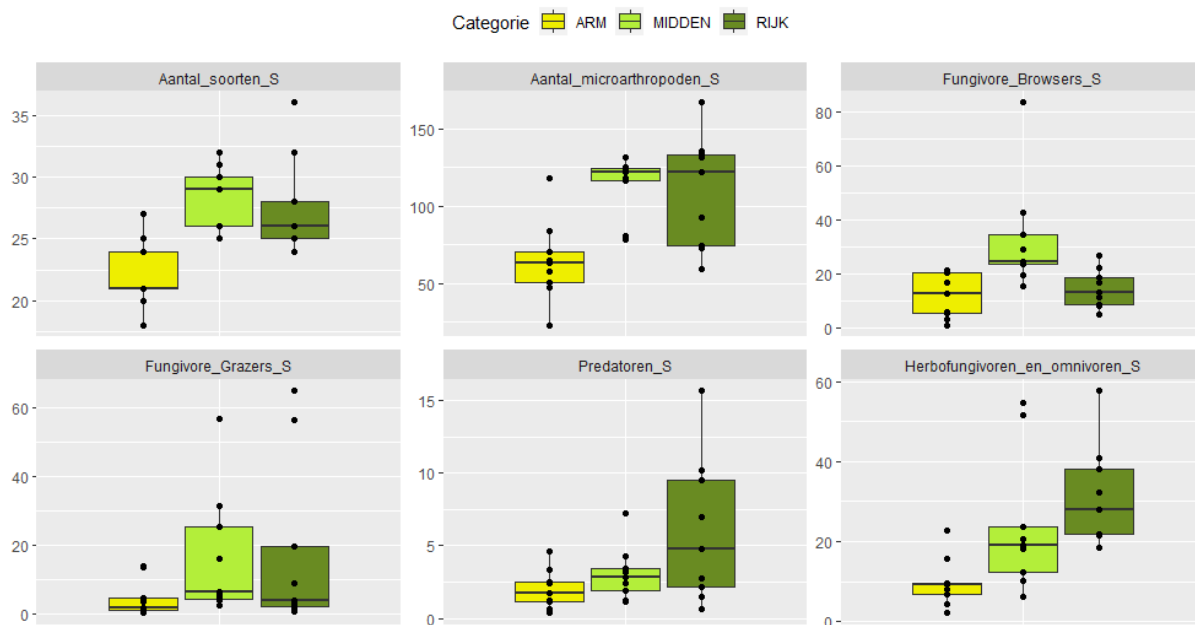
ARM	MIDDEN	RIJK
Hoogstraten	Loon op Zand	Genk Strip
't Zand	Someren	Veldhoven
Grashoek	As	Walbeck

Bodem- en strooiselbiota voor de 3 boscategorieën.

Met betrekking tot P en klei/silt zien we onderscheidt tussen de drie categorieën. De biota in de strooisellaag en de bodemlaag werden vervolgens uitgezet tegen deze drie categorieën. Figuur 3-5 toont boxplots (de box toont de range met 25-75% van de data) met de diverse biota groepen in deze lagen voor de 3 categorieën. Boxplots voor herbivore grazers zijn niet getoond maar zijn te vinden in bijlage 1.2.

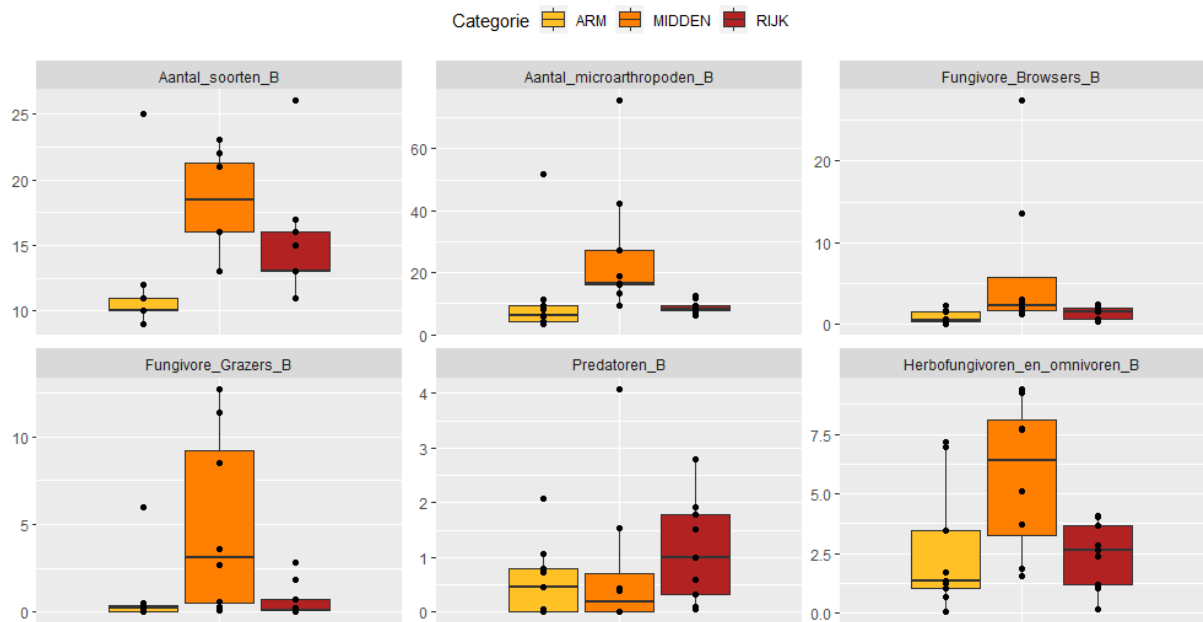
Bodembiota in de Strooisellaag

(aantal x 1000/m²)



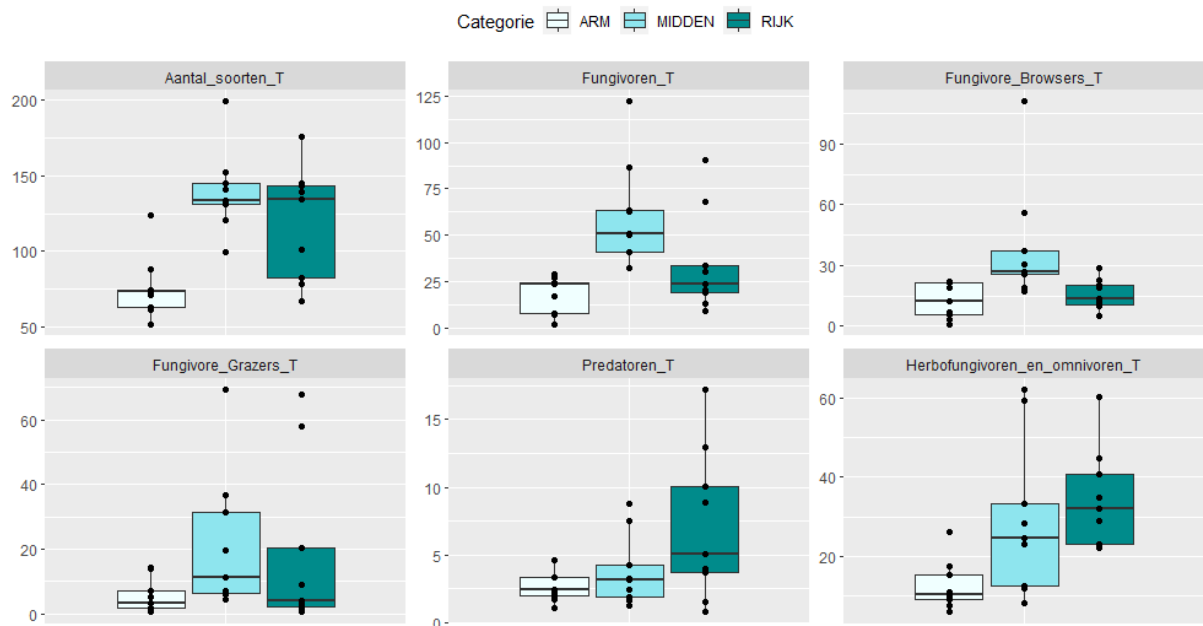
Figuur 3. Boxplots voor aantal soorten, aantal microarthropoden, fungivore browsers, fungivore grazers, predatoren en herbofungivore+omnivoren in de strooisellaag van de bemonsterde bossen. de 3 boscategorieën zijn weergegeven met kleuring van arm (geel), midden (lichtgroen) naar rijk (donkergroen).

Bodembiota in de Bodemlaag (aantal x 1000/m²)



Figuur 4. Boxplots voor aantal soorten, aantal microarthropoden, fungivore browsers, fungivore grazers, predatoren en herbofungivore+omnivoren in de bodemlaag van de bemonsterde bossen. de 3 boscategorieen zijn weergegeven met kleuring van arm (geel), midden (oranje) naar rijk (donkerrood).

Microarthropoden in de strooisel en bodemlaag (aantal x 1000/m²)



Figuur 5. Boxplots voor aantal soorten, aantal fungivoren, fungivore browsers, fungivore grazers, predatoren en herbofungivore+omnivoren in de beide lagen (strooisellaag en bodemlaag samen) van de bemonsterde bossen. de 3 boscategorieen zijn weergegeven met kleuring van arm (lichtblauw), midden (blauw) naar rijk (donkerblauw).

Analyse met microarthropoda data

Microarthropoden werden gemeten als absolute aantallen. Hierbij werden totaal aantal, het aantal soorten maar ook het aantal fungivore browsers, -grazers, het aantal herbivore browsers en -grazers en het aantal predatoren geteld (zie tabel 3).

Tabel 3. Biota groepen welke werden gemeten voor de strooisellaag en de bodemlaag.

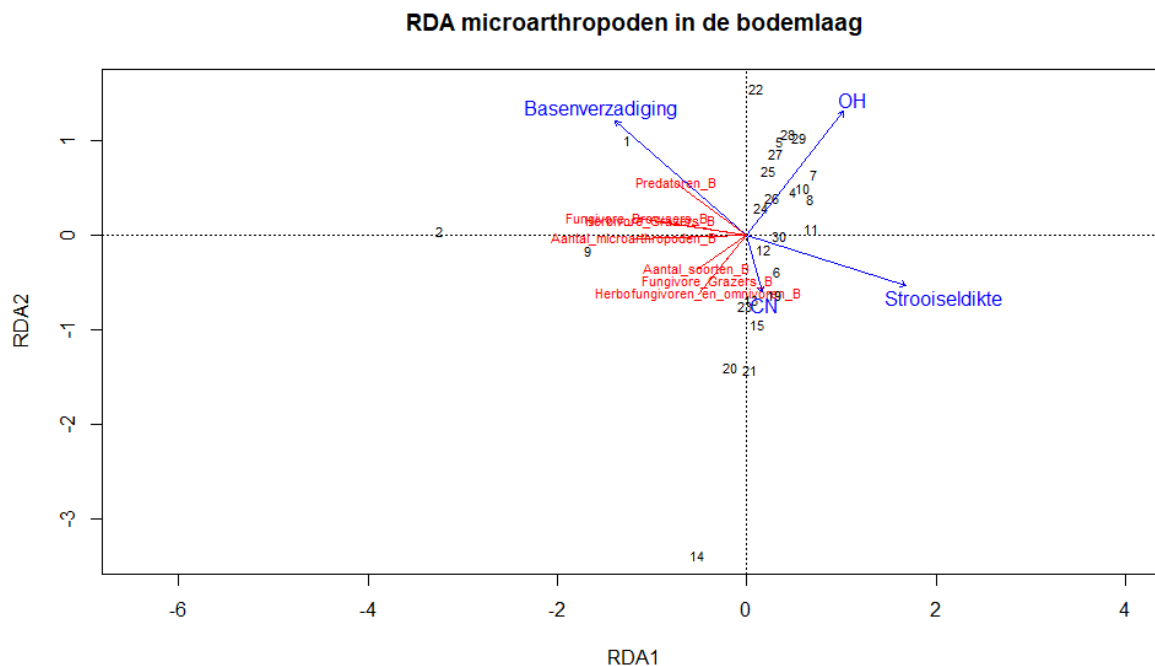
Microarthropoden	Opmerking
totaal aantal microarthropoden	
Total aantal gevonden soorten	
fungivorous browser	
fungivorous grazer	
Herbivorous browser	deze variabele wordt niet geanalyseerd vanwege te weinig waarnemingen in een groot deel van de locaties
herbivorous grazer	
herbofungivores+omnivores	
predatoren	
fungivoren=fungivore browsers+fungivore grazers	

Microarthropoden in de bodem

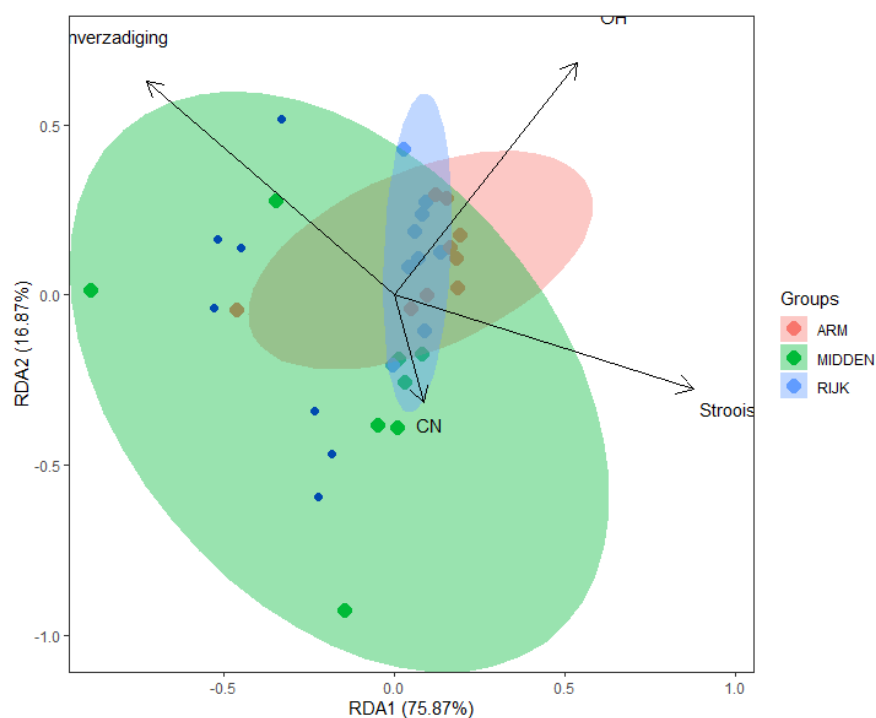
Na de selectie van variabelen werd een RDA uitgevoerd waarin aantallen van bovenstaande soortgroepen werden verklaard door de geselecteerde milieuvariabelen. Dit werd gedaan met een stapsgewijze eliminatie van niet significante milieuvariabelen. Hierbij werd gezocht naar een (significant) verklarend multivariaat model. Het aantal herbivore browsers is laag en in veel locaties niet aangetroffen. Deze variabele is uit de analyses gehouden.

Het best verklarende model (voor de biota uit de bodemlaag) bleek een model met de milieuvariabelen: **strooiseldikte**, **OH**, **CN** en **Basenverzadiging**. Onderstaande RDA toont de resultaten van dit model (figuur 6).

Het aantal soorten in de bodemlaag, het aantal fungivore grazers en aantal herbofungivore en omnivoren neemt toe bij een lagere OH. De predatoren, fungivore browsers en herbivore grazers nemen toe naarmate de buffering (basenverzadiging en basische kationen) toeneemt. Echter vinden we relatief weinig differentiatie voor wat betreft de bodembiota tussen de verschillende categorieën van bossen. Dit blijkt uit de flinke overlap van de betrouwbaarheids-eclipsen in de RDA van figuur 7. Bij toenemende strooiseldikte zien we minder predatoren, fungivore browsers en herbivore grazers in de bodemlaag.



Figuur 6. RDA voor biota uit de bodemlaag en milieuv variabelen na stapsgewijze selectie van deze variabelen. De blauwe pijlen tonen de milieuv variabelen die na stepwise reductie als significant overbleven in het model. De rode pijlen tonen de responsvariabelen. Locaties worden weergegeven met de getallen. (Schaling op basis van gewogen gemiddelde tussen variabelen)



Figuur 7. RDA voor biota uit de bodemlaag met grafische weergave van het voorkomen van 95% van de locaties binnen een bepaalde groep (type bos, arm, midden of rijk). Milieuv variabelen zijn getoond met zwarte pijlen. Donker blauwe punten zijn de bodem biota. Gekleurde grotere bollen zijn de respectievelijke boslocaties van de betreffende categorie.

Lineaire modellen Bodembiota

Vervolgens is per soortgroep onderzocht welke (combinatie van) milieuvariabelen het beste het voorkomen (en aantallen) van de soortgroepen in de bodemlaag verklaart. Hiervoor zijn lineair mixed models gebruikt zodat rekening kon worden gehouden met meerdere metingen per locatie (locatie meegenomen als random effect). Alle verklarende variabelen zijn hiervoor gestandaardiseerd zodat variabelen met verschillende eenheden met elkaar vergeleken kunnen worden. De resultaten van de multivariate modellen staan weergegeven in tabel 4. De effectgroottes van de variabelen zijn weergegeven in bijlage 1.3

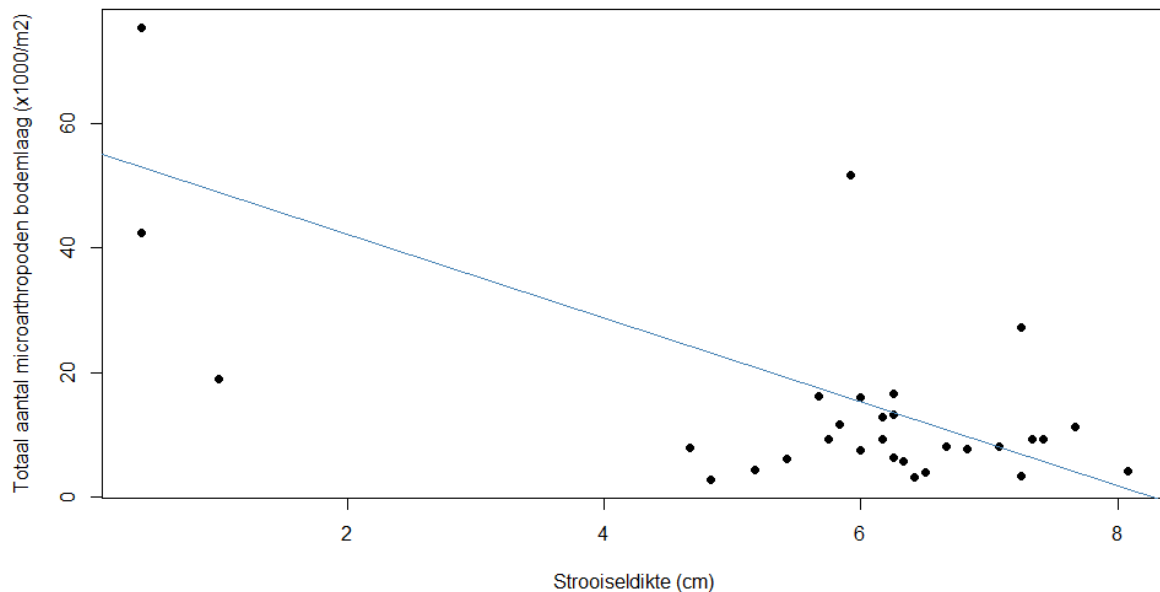
Tabel 4. Resultaten van de lme modellen voor biota in de bodemlaag. Getoond zijn de richtingen van effect van de verklarende milieuvariabelen. Significatieniveau: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positieve effecten zijn weergegeven met blauwe opwaartse pijlen. Negatieve effecten zijn weergegeven met rode neerwaartse pijlen. Voor het totaal aantal soorten werden geen significante variabelen in een meervoudig mixed model gevonden.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal aantal microarthropoden	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen							
	basenverzadiging					↑***		
Zuurgraad	pH							
	Al							
Eutrofie	NH ₄							
	NO ₃							
	P		↓*					
Habitat	Organische stof							
	Strooiseldikte	↓***		↓***			↓***	
	Klei							
	Silt		↑**					
	OF				↑**			
	CN			↑***			↓**	

Ondanks dat de bodembiota niet in de strooisellaag zijn bemonsterd (maar in de bodemlaag) lijkt er toch een negatief verband te zijn met de strooiseldikte voor enkele van de gevonden groepen. Echter deze relaties (ook al zijn ze wel significant) zijn niet sterk zoals te zien is in onderstaande lineaire model (figuur 8). Voor andere groepen is het voorkomen van een OF of OL laag juist positief.

CN ratio, werd recent gezien als een slechte voorspeller voor de strooiselafbraak en humuskwaliteit (Desie et al 2020). In dit onderzoek zien we CN wel positief gerelateerd zijn aan herbivore grazers en negatief met totaal aantal microarthropoden.

Bijlage 1.4 toont enkele additionele lineaire modellen



Figuur 8. Aantal microarthropoden (bodemlaag) uitgezet tegen de strooiseldikte.

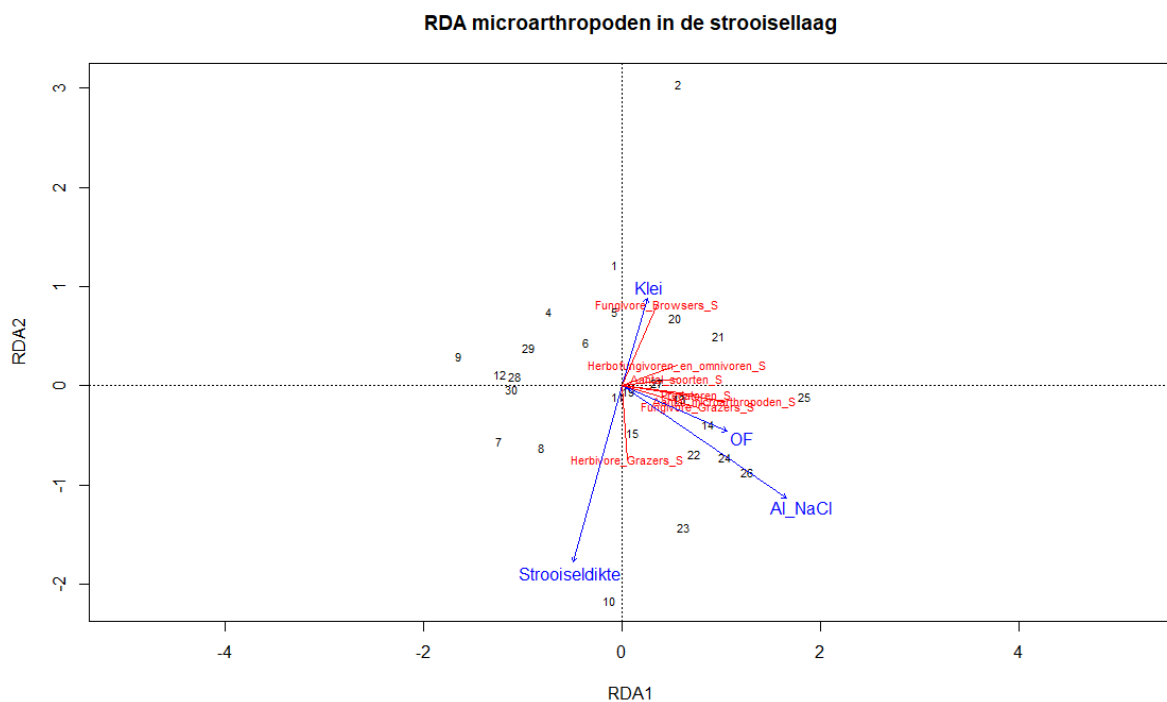
Microarthropoden in de strooisellaag

Na selectie van de meest variërende en niet gecorreleerde variabelen werd een RDA uitgevoerd waarin aantallen de soortgroepen in de strooisellaag werden verklaard door de geselecteerde milieuvariabelen. Dit werd gedaan met een stapsgewijze eliminatie van niet significante milieuvariabelen. Hierbij werd gezocht naar een (significant) verklarend multivariaat model. Het aantal herbivore browsers is laag en in veel locaties niet aangetroffen. Deze response-variabele is uit de analyses gehouden.

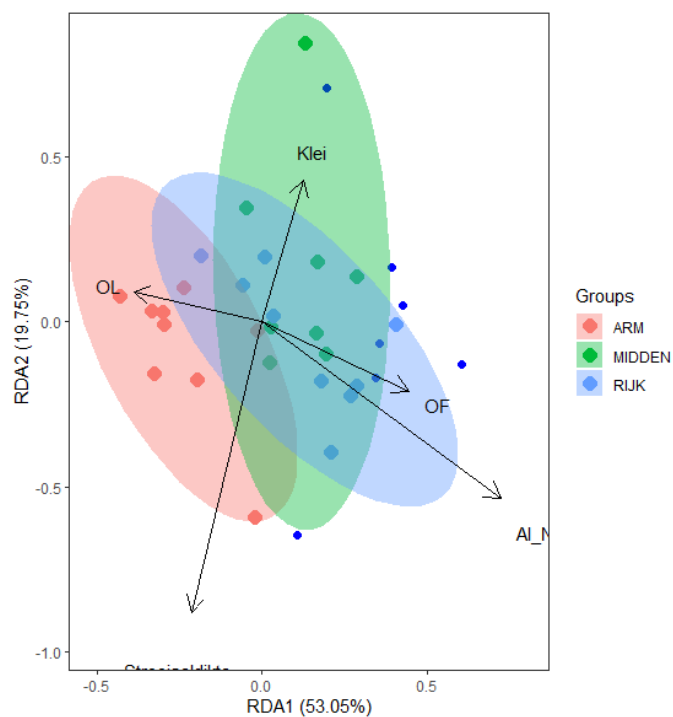
Het best verklarende model (voor de biota uit de strooisellaag) bleek een model met de milieuvariabelen: **strooiseldikte**, **OH laag**, **Aluminium** en het **gehalte aan klei**. Onderstaande RDA (figuur 9) toont de resultaten van dit model.

Het aantal soorten in de strooisellaag, het aantal fungivore browsers en aantal herbofungivore en omnivoren neemt toe bij een dunnere strooisellaag en dunnere OL maar deze verbanden zijn niet sterk. Fungivore browsers lijken meer voor te komen bij hogere klei gehalten.

Wederom vinden we relatief weinig differentiatie voor wat betreft de bodembiota tussen de verschillende categorieën van bossen (figuur 10). Dit blijkt uit de flinke overlap van de betrouwbaarheids-eclipsen in de RDA. Wat betreft de bodembiota lijken de categorieën (rijk, midden en arm bos) dus sterk op elkaar.



Figuur 9. RDA voor biota uit de strooisellaag en milieuvariabelen na stapsgewijze selectie van deze variabelen. De blauwe pijlen tonen de milieuvariabelen die na stepwise reductie als significant overbleven in het model. De rode pijlen tonen de responsvariabelen. Locaties worden weergegeven met de getallen. (Schaling op basis van gewogen gemiddelde tussen variabelen)



Figuur 10. RDA voor biota uit de strooisellaag met grafische weergave van het voorkomen van 95% van de locaties binnen een bepaalde groep (type bos, arm, midden of rijk). Milieuvariabelen zijn getoond met zwarte pijlen. Donker blauwe punten zijn de biota. Gekleurde grotere bollen zijn de respectievelijke boslocaties van de betreffende categorie.

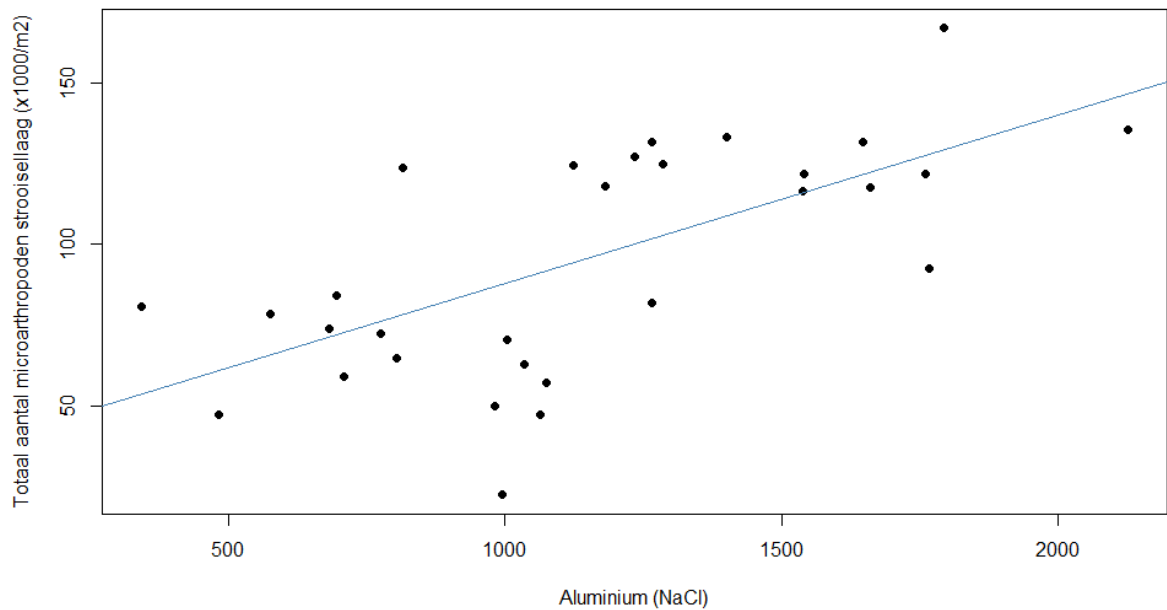
Lineaire modellen Strooiselbiota

Per soortgroep werd wederom onderzocht welke (combinatie van) milieuvariabelen het beste het voorkomen (en aantallen) van de soortgroepen in de strooisellaag verklaart. Hiervoor zijn lineair mixed models gebruikt zodat rekening kon worden gehouden met meerdere metingen per locatie (locatie meegenomen als random effect). Alle verklarende variabelen zijn hiervoor gestandaardiseerd zodat variabelen met verschillende eenheden met elkaar vergeleken kunnen worden.

Tabel 5. Resultaten van de lme modellen voor biota in de strooisellaag. Getoond zijn de effect groottes van de verklarende milieuvariabelen. Significantieniveau: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positieve effecten zijn weergegeven met blauwe opwaartse pijlen. Negatieve effecten zijn weergegeven met rode neerwaartse pijlen. Voor het aantal omnivoren werden geen significante variabelen in een meervoudig mixed model gevonden. Geen significanties gevonden voor totaal aantal soorten of omnivoren.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal aantal microarthropoden	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen	↑***	↑*			↑**		
	basenverzadiging	↑*		↓*			↓.	
Zuurgraad	pH			↑*				
	Al		↑.				↑**	
Eutrofie	NH4							
	NO3					↑***		
	P							
	Mn							
Habitat	Organische stof							
	Strooiseldikte	↓**						
	Klei			↓*		↑*		
	Silt							
	OF	↓**						
	CN							

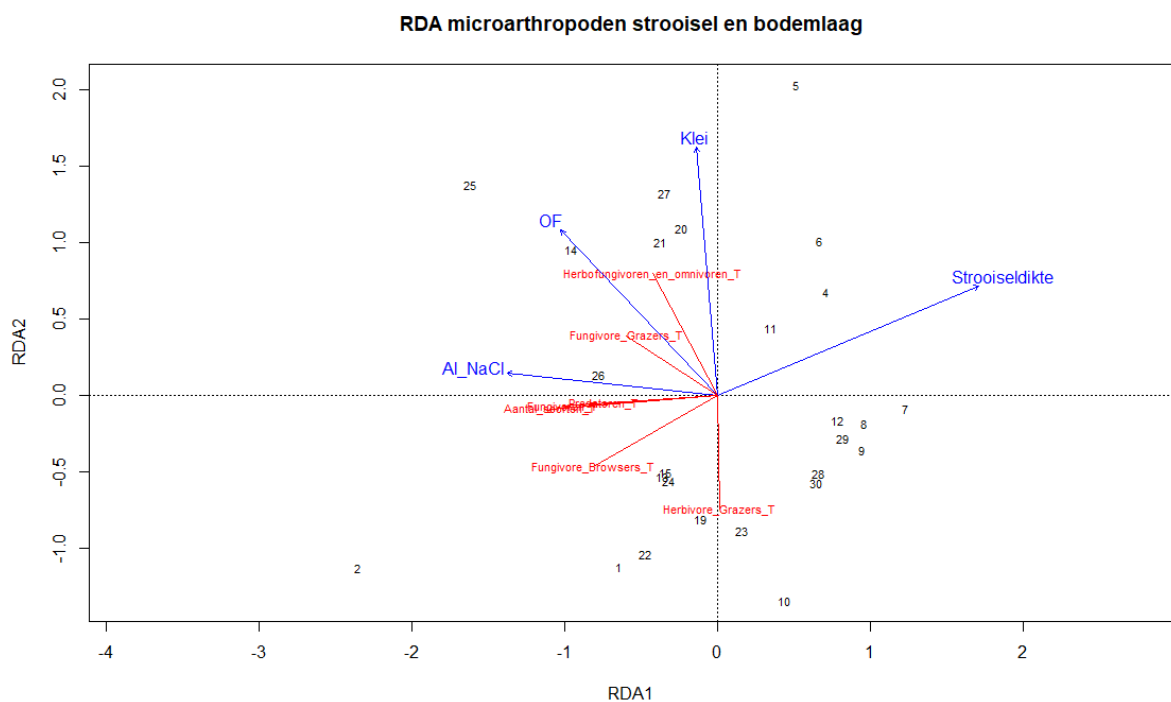
Bovenstaande tabel 5 geeft de mixed models weer. Te zien is dat het aantal microarthropoden significant positief wordt beïnvloed door het vrij beschikbare aluminium. De relatie met het vrij beschikbare aluminium is weergegeven in figuur 11.



Figuur 11. Aantal microarthropoden strooisellaag uitgezet tegen de aluminiumconcentratie in de bodem (zoutextracten)

Microarthropoden in beide lagen (strooisel en bodem)

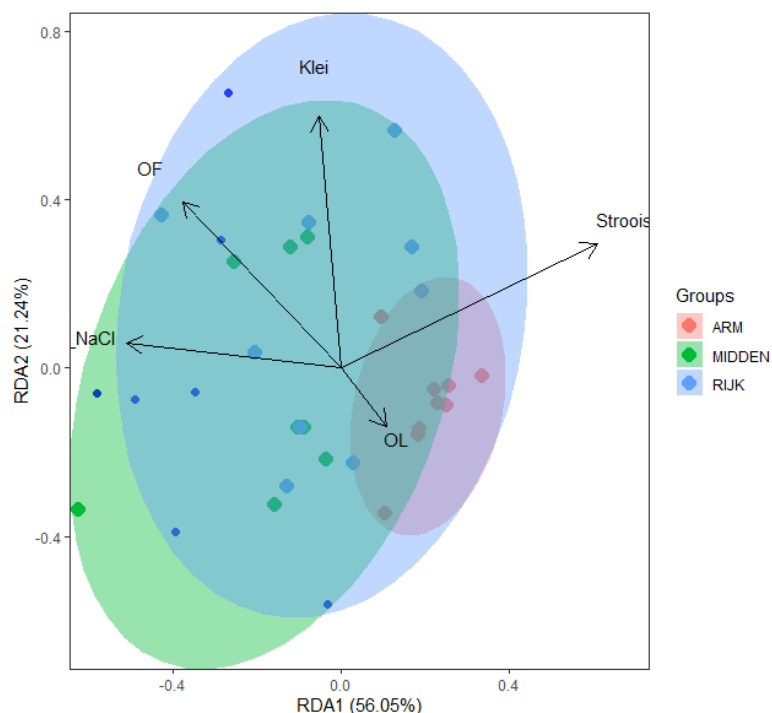
Na stapsgewijze eliminatie van niet significante milieuvariabelen werden de volgende variabelen in het best verklarende model (voor de biota uit de strooisellaag en de bodemlaag samen) gevonden: **strooiseldikte**, **OF laag**, **Aluminium** en het **gehalte aan klei**. Onderstaande RDA toont de resultaten van dit model (figuur 13).



Figuur 13. RDA voor biota uit de strooisellaag en de bodemlaag samen (totalen) en milieuvariabelen na stapsgewijze selectie van deze variabelen. De blauwe pijlen tonen de milieuvariabelen die na stepwise reductie als significant overbleven in het model. De rode pijlen tonen de responsvariabelen. Locaties worden weergegeven met de getallen. (Schaling op basis van gewogen gemiddelde tussen variabelen)

Het totaal aantal soorten en het aantal fungivore browsers neemt toe bij een dunnere strooisellaag (dit is OL, OF en OH samen). Wanneer we alleen naar de OF kijken dan zien we een toename van fungivore grazers en herbofungivoren en omnivoren.

Wederom vinden we relatief weinig differentiatie voor wat betreft de bodem- en strooiselbiota tussen de verschillende categorieën van bossen. Dit blijkt uit de flinke overlap van de betrouwbaarheids-eclipsen in de RDA (figuur 14). Wat betreft de biota lijken de categorieën (rijk, midden en arm bos) dus sterk op elkaar.



Figuur 14. RDA voor biota uit de strooisellaag en de bodemlaag samen (totalen) met grafische weergave van het voorkomen van 95% van de locaties binnen een bepaalde groep (type bos, arm, midden of rijk). Milieuvariabelen zijn getoond met zwarte pijlen. Donker blauwe punten zijn de biota. Gekleurde grotere bollen zijn de respectievelijke boslocaties van de betreffende categorie.

Lineaire modellen Strooisel- en bodembiota samen

Tabel 6 toont de resultaten van lineair mixed models. Hierin kon rekening gehouden worden met meerdere metingen per locatie door locatie mee te nemen als random effect. Alle verklarende variabelen zijn hiervoor gestandaardiseerd zodat variabelen met verschillende eenheden met elkaar vergeleken kunnen worden.

Wederom lijkt strooiseldikte vaak een negatieve relatie te hebben met het voorkomen van enkele groepen. Uitzondering hierop zijn de predatoren die positief beïnvloed worden door strooiseldikte.

Zuurgraad van de bodem lijkt negatief te zijn voor totaal aan omnivoren en fungivoren. De resultaten van deze tabel zijn echter moeilijker te interpreteren omdat hier de positieve effecten van de strooisellaag contrasteren met negatieve of afwezige effecten in de bodemlaag. Hierdoor zijn effectgroottes van de variabelen voor de strooisel en bodembiota samen zeer klein en lijken meerder richtingen op te wijzen.

Tabel 6. Resultaten van de lme modellen voor biota in de beide lagen. Getoond zijn de effect groottes van de verklarende milieuvariabelen. Significantienniveau: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Positieve effecten zijn weergegeven met blauwe opwaartse pijlen. Negatieve effecten zijn weergegeven met rode neerwaartse pijlen.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal Fungivoren	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen				↓ ***	↓ ***		
	basenverzadiging					↑ ***	↑ **	
Zuurgraad	pH				↓ **		↓ **	
	Al				↑ **		↑ *	↑ ***
Eutrofie	NH ₄							
	NO ₃				↑ **	↑ ***	↓ *	
	P					↓ ***		
	Mn					↑ **		
Habitat	Organische stof		↑ *					
	Strooiseldikte	↓ ***			↓ ***	↑ **		↓ ***
	Klei			↓ **		↓ ***		
	Silt			↓ *		↑ ***		
	OF			↓ *	↑ ***			↑ **
	CN				↓ *	↓ ***	↓	

Bijlage 1.1 Selectie van variabelen voor analyse

Doel van dit onderzoek is het aantonen van statistische verbanden tussen de aantallen en biodiversiteit van microarthropoden en de beschikbaarheid van macro- en micronutriënten.

Hypothesen die gesteld kunnen worden in dit onderzoek zijn de volgende:

- 1) We verwachten dat de efficiëntie van de strooiselafbraak toeneemt wanneer het stikstofgehalte (N) zorgt voor een verlaging van de C:N ratio.
- 2) Daarnaast zal de verzuring leiden tot een uitspoeling van (sporen)elementen en afname van de buffering wat leidend kan zijn voor bodemleven. Eerder onderzoek heeft al aangetoond dat met name de basische kationen in deze zure bossen een goed beeld geven van de afbraak, beter dan de CN ratio.
- 3) Bij hogere P gehalten in de bodem zal de N/P ratio lager zijn en mag men een snellere afbraak verwachten.

Bij bovenstaande hypothesen horen een aantal belangrijke milieuparameters die gemeten zijn en welke geanalyseerd kunnen worden. Simpel gezegd zijn deze parameters terug te voeren naar indicatoren voor: *eutrofie*, *verzuring/buffering* en *habitat*.

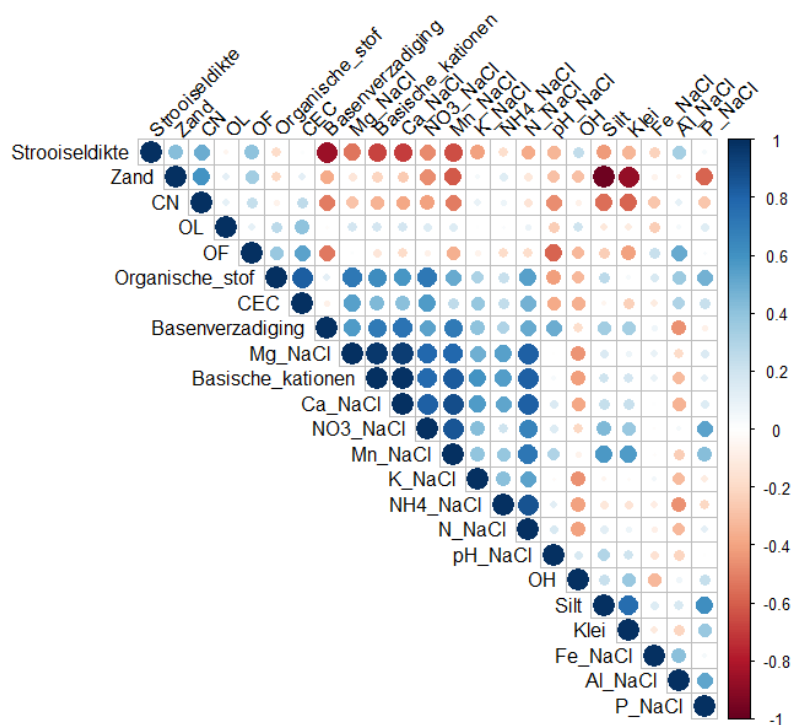
Op de veldlocaties is stikstof gemeten in ammonium en nitraatvorm. Dit zijn de dominante vormen van mineraal stikstof. Het totaal gehalte aan N is slechts in een subset gemeten maar uit eerder onderzoek (Desie et al 2019) bleek dat, vanwege de hoge mate van stikstofverrijking in de bodem, dit gehalte een slechte voorspeller is voor bodemleven en strooiselafbraak. Omdat veel (ouder) onderzoek de CN ratio toch als voorspeller van de afbraak ziet werd deze wel meegenomen in de analyse. Als maat voor de buffering kunnen basische kationen afzonderlijk worden getoetst. Deze zijn gemeten als totalen (na zuurdestructie) of als beschikbare kationen (na zoutextractie). Als maat voor verzuring kan men de pH nemen maar omdat aluminium vrij komt bij verzuring is ook de mate van vrij (uit een zoutextract) aluminium mogelijk een goede voorspeller voor het voorkomen van biota en de mate van strooiselafbraak. Daarnaast is vrij aluminium in bepaalde concentraties toxisch voor sommige biota.

De CEC bleek van belang in het onderzoek van Desie. CEC wordt mede bepaald door het gehalte aan klei/silt ten opzichte van zand waarbij klei meer bindingsplekken heeft dan zand en daarmee een hogere CEC. Ook het organische stof gehalte speelt hierbij een rol; hogere organische stof gehalten resulteren in meer bindingsplaatsen voor kationen en dus een hogere CEC. Deze parameters zijn allen in de minerale bodem bepaald. Tenslotte is het gehalte aan fosfor (P) bepaald in de bodem aan als totaalgehalte (na zuurdestructie) of als beschikbaar P (na zoutextractie). Beide kunnen getoetst worden.

Aangezien het voorkomen van de biota, naast een biochemische invloed, ook bepaald wordt door het beschikbare habitat zijn voorts de hoeveelheid strooisel, en de dikte van de OL, OF en OH laag van belang.

Datareductie bodemchemie (zoutextracten) 0-10cm

Onderstaande matrix (figuur B1) geeft de correlatiematrix van variabelen uit het zoutextract (+ organische stof gehalte, strooiseldikte (TotalO) en zand-, klei- en siltfractie). De kleuringen zijn indicatief voor positieve relaties (blauw) en negatieve relaties (rood). De grootte van de bolletjes geven de mate van correlatie (de correlatiecoëfficiënt) weer.



Figuur B1. Correlatiematrix op basis van bodemchemie (0-10cm) zoutextracten

Op basis van de correlatiematrix werden de volgende hoge ($-0.7 > r > 0.7$) correlatie coëfficiënten verkregen:

variabelen		Corr. Coefficient
OS	NO3_NaCl	0.72
OS	Mg_NaCl	0.71
OS	CEC	0.83
BK	NO3_NaCl	0.78
BK	Ca_NaCl	0.98
BK	Mg_NaCl	0.96
BK	Mn_NaCl	0.84
BK	Nmin_NaCl	0.82
NO3_NaCl	Ca_NaCl	0.82
NO3_NaCl	Mg_NaCl	0.78
NO3_NaCl	Mn_NaCl	0.85
NH4_NaCl	Nmin_NaCl	0.87
Ca_NaCl	Mg_NaCl	0.94
Ca_NaCl	Mn_NaCl	0.88
Ca_NaCl	Nmin_NaCl	0.82
Ca_NaCl	BV	0.74
Mg_NaCl	Mn_NaCl	0.78
Mg_NaCl	Nmin_NaCl	0.82
Mn_NaCl	Nmin_NaCl	0.73
BV	strooisel_cn	-0.86

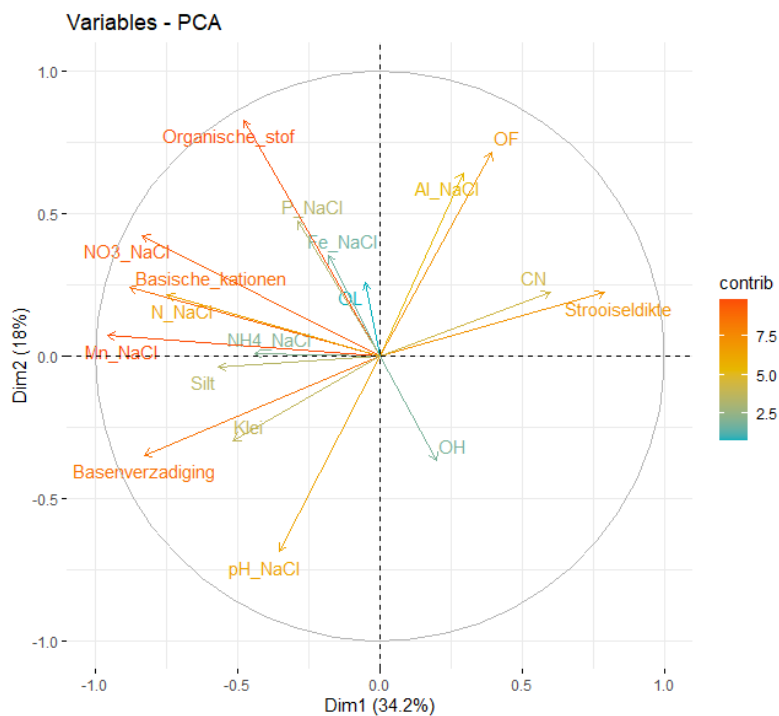
- In de correlatie matrix zien we dat basische kationen (de som van Ca, Mg, K) gecorreleerd is met calcium, magnesium en mangaan. Het is verstandig om hier voor een simpeler model te kiezen. Dat betekent dat we kiezen voor de variabele "basische kationen". De afzonderlijke kationen worden verder weggelaten uit de analyse.

- De som van basische kationen is ook positief gecorreleerd met nitraat en mineraal N (de som van nitraat en ammonium)
- CEC wordt voor een groot deel bepaald door de organische stof en in deze zandige bodems minder door kalkgehalte. Omdat organische stof gehalte een relatief makkelijk te analyseren parameter is en omdat het bufferend vermogen van de bodem hier beter door basische kationen wordt weergegeven dan door CEC (deze is immers hier veelal bezet met aluminium of ammonium) wordt CEC niet meegenomen in de verdere analyse.
- Mangaan zit niet in de som van basische kationen. Is er echter wel sterk aan gecorreleerd (0.84). Mangaan is van belang bij enzymreacties en gedraagt zich daarmee anders dan bijvoorbeeld calcium.
- Nitraat blijkt gecorreleerd met een aantal parameters terwijl ammonium dat niet is. De relaties duiden op een hoger nitraat gehalte naarmate de buffering van de bodem beter is (meer bufferende kationen). Dit kan duiden op een hogere nitrificatie bij een hogere buffering. Het samenvoegen van ammonium en nitraat tot de variabele "mineraal N" resulteert in een variabele (mineraal N) die met meer andere variabelen gecorreleerd is. Dit is dus voor het model onwenselijk: nitraat en ammonium worden als afzonderlijke variabelen behouden.
- Strooiseldikte (gemeten op 6 plekken rond elke boom) is sterk negatief gecorreleerd aan basenverzadiging.
- Basenverzadiging is (maar niet >0.7) gecorreleerd met pH en basische kationen.
- Zand is sterk negatief gecorreleerd met silt en klei, het is niet nodig alle drie mee te nemen in verdere analyse. Gekozen wordt voor klei en siltfracties

Op basis van bovenstaande conclusies uit de correlatiematrix zijn de volgende variabelen meegenomen in de verdere multivariate analyse: **Organische stof gehalte, pH, basische kationen, NO₃, NH₄, Al, Fe, P, Mn, BV, strooiseldikte, OL, OF, OS, klei en silt**. Mn wordt ook meegenomen met die kanttekening dat deze sterk gecorreleerd is aan basische kationen

Na selectie van de variabelen op basis van de correlatiematrix werd in een DCA bekeken of verdere analyse in CCA of PCA uitgevoerd kan worden. Bij een lengte van de 1^e as van <3 wordt de data als homogeen gezien en daarom geschikt voor lineaire methodes zoals PCA en RDA. De lengte van de 1^e as in bovenstaande dataset is rond de 1 en dus kunnen we verder met PCA en RDA.

Aan de hand van een PCA (figuur B2) is vervolgens nog gekeken worden welke variabelen sterk verschillen tussen de locaties en welke niet.



Figuur B2. PCA van de bodemchemiegegevens (0-10cm zoutextracten) met de relatieve contributie van de variabelen

Bovenstaande figuur geeft aan tot in hoeverre (de relatieve bijdrage) de milieuvariabelen bijdragen aan de verschillen tussen de locaties. Hoe langer de pijl (en hoe roder) hoe meer de variabele bijdraagt aan de variatie tussen de verschillende locaties. Uit de PCA blijkt wel dat de variabelen OL en OH relatief weinig verschillen tussen de locaties (deze dragen dan ook weinig bij aan de variatie tussen de locaties). Zoals uit eerder onderzoek blijkt zien we hier een minder grote variatie in CN ratio ten opzichte van de buffering of strooiseldikte.

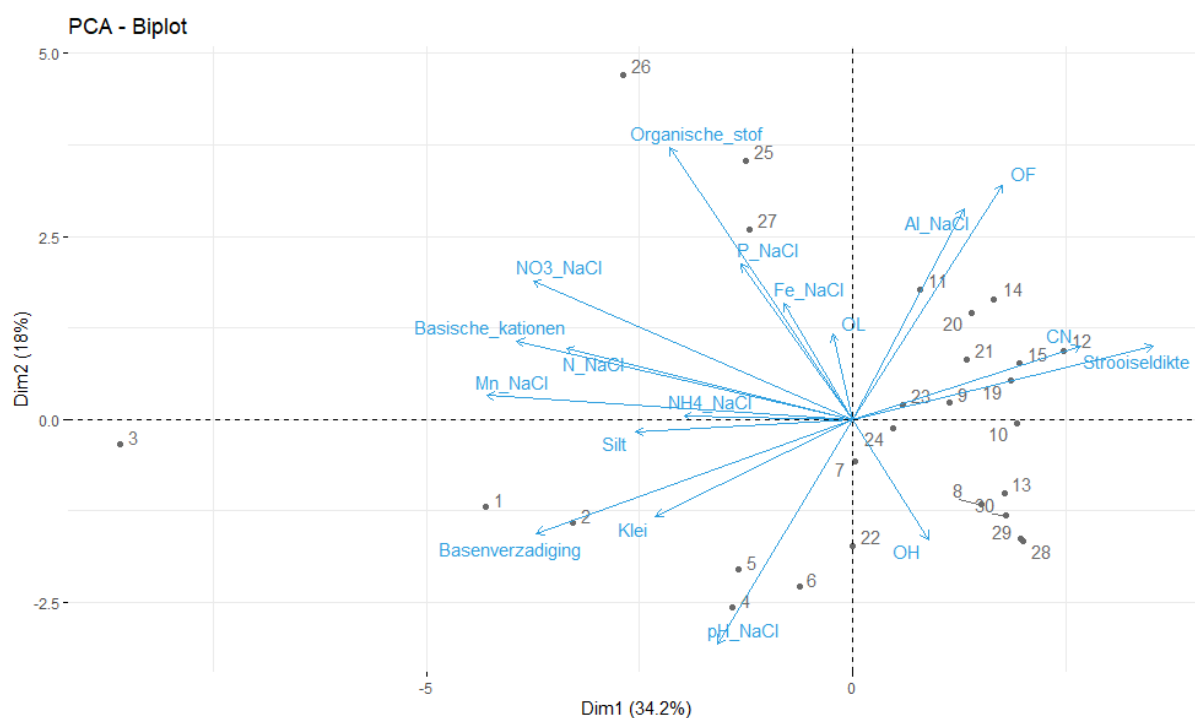
De locaties in de PCA worden weergegeven aan de hand van ID nummers. Onderstaande tabel 1 geeft de ID codes, de bijbehorende locaties en coderingen WENR

Tabel 1. Coderingen voor interpretatie van de nummering in de RDA en PCA biplots

ID	Locatie	Plotnr WENR
1	As	1
2	As	2
3	As	3
4	Genk strip	1
5	Genk strip	2
6	Genk strip	3
7	Grashoek	1
8	Grashoek	2
9	Grashoek	3

10	Hoogstraten	1
11	Hoogstraten	2
12	Hoogstraten	3
13	Loon op zand	1
14	Loon op zand	2
15	Loon op zand	3
16	Otterlo	1
17	Otterlo	2
18	Otterlo	3
19	Someren	1
20	Someren	2
21	Someren	3
22	Veldhoven	1
23	Veldhoven	2
24	Veldhoven	3
25	Walbeck	1
26	Walbeck	2
27	Walbeck	3
28	t'Zand	1
29	t'Zand	2
30	t'Zand	3

De locaties (zie tabel) kunnen in een PCA zichtbaar gemaakt worden in een zogenaamde biplot (figuur B3).



Figuur B3. PCA-biplot van de bodemchemiegegevens (0-10cm zoutextracten) met de variabelen en de locaties weergegeven.

Bovenstaande figuur B3 geeft de PCA van de milieuvariabelen en de verschillende locaties weer. We zien dat locaties nr. 1,2,3 (As), 25,26 en 27 (Walbeck) zijn duidelijk anders dan de overige locaties. Walbeck en As werden op basis van de totaalgehalten in de bodemchemie (20-30cm) geselecteerd als een respectievelijk rijkere en middelrijke locatie. Walbeck werd ingeschat als rijkere locatie en deze zien we ook in de zoutextracten in de toplaag met relatief meer organische stof en hogere P waarden. IJzer is niet erg differentiërend tussen de locaties en geeft ook geen duidelijke relatie met

pH of aluminium. Aluminium en pH daarentegen zijn wel sterk differentiërend. OL en OH ook niet maar deze kunnen voor de biota wel sterk bepalend zijn. Mineraal N is de som van nitrat en ammonium en zit ook in de PCA hier tussenin. CN ratio komt overeen met strooiseldikte maar is minder variabel.

In onderstaande tabel is weergegeven welke variabelen wel of niet worden meegenomen in de vervolganalysen.

Indicator	variabelen					
Zuurgraad	pH	Al	Fe			
Buffering	basenverzadiging	basische kationen	Mg	Ca	Mn	K
Eutrofie	NH ₄	NO ₃	P	Mineraal N	S	
Habitat	Strooiseldikte	Organische stof	OL	OF	OS	CN

Toelichting:

groen	Variabele gaat mee naar vervolganalyse
oranje	Variabele wordt vervangen door een nieuwe samengevoegde variabele Ca, Mg, en K worden samengevoegd in de variabele BK (Basische kationen)
rood	Variabele niet mee in vervolg analyse vanwege correlaties met andere variabele

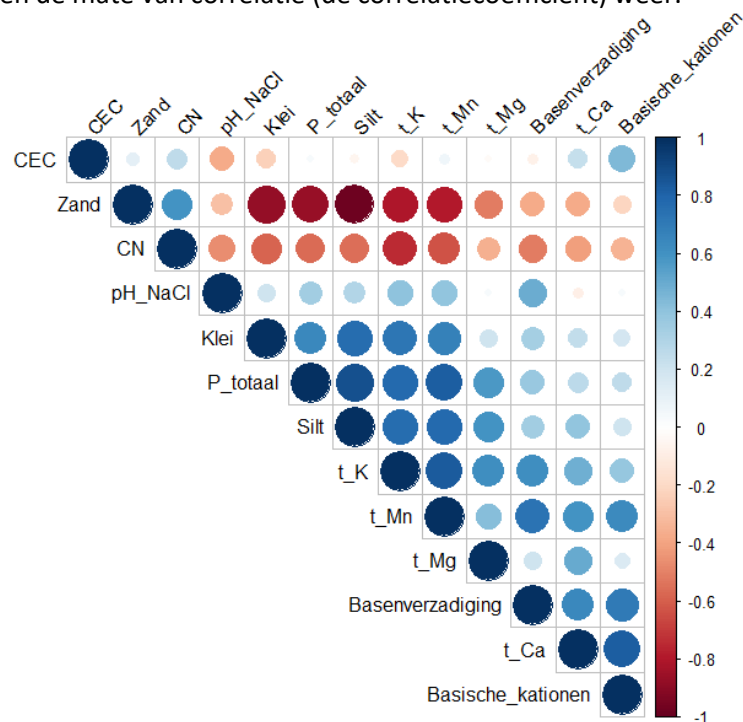
Conclusies datareductie zoutextracten 0-10cm

- De kationen calcium, magnesium en kalium worden samengenomen onder de variabele "basische kationen"
- Mn meegenomen maar met kanttekening vanwege hoge correlatie met basische kationen
- CEC correleert met org. stof waardoor deze niet mee kan in verdere analyse
- S, Zn, Fe te weinig differentiërend tussen locaties, niet mee in analyse
- Mineraal N niet gebruikt als variabele maar de afzonderlijke variabelen nitraat en ammonium

Datareductie bodemchemie (totalen (destructies)) 0-10cm

Voor de totalen zijn met name het gehalte aan P, CN ratio en de basische kationen interessant.

Onderstaande matrix (figuur B4) geeft de correlatiematrix van variabelen uit de destructies (+ organische stof gehalte, strooiseldikte (TotalO) en zand-, klei- en siltfractie). De kleuringen zijn indicatief voor positieve relaties (blauw) en negatieve relaties (rood). De grootte van de bolletjes geven de mate van correlatie (de correlatiecoëfficiënt) weer.



Figuur B4. Correlatiematrix op basis van bodemchemie (0-10cm) destructies

Op basis van de correlatiematrix werden de volgende hoge ($-0.7 > r > 0.7$) correlatie coëfficiënten verkregen:

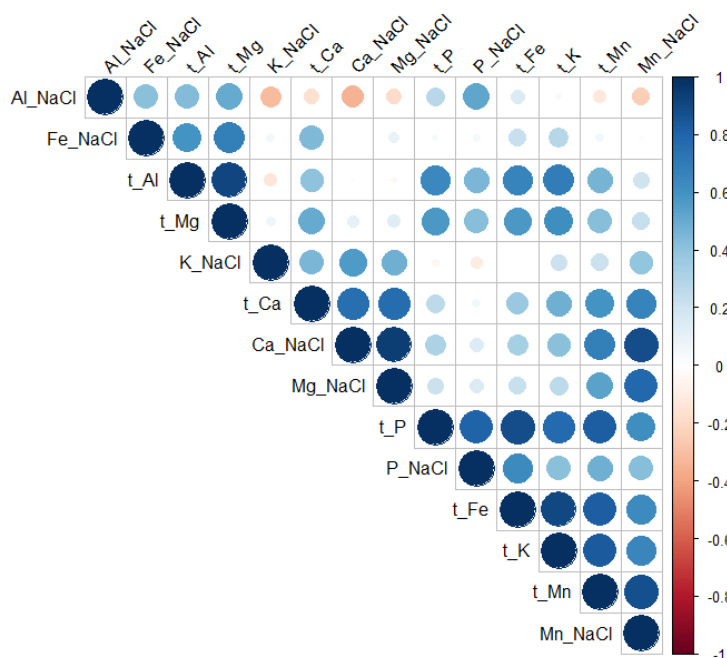
variabelen	Corr. Coefficient
t_Ca BK	0.82
t_K t_Mn	0.83
t_K t_P	0.78
t_K Sand	-0.8
t_K Silt	0.77
t_K Clay	0.72
t_K CN	-0.74
t_Mn t_P	0.83
t_Mn BV	0.74
t_Mn Sand	-0.8
t_Mn Silt	0.77
t_P Sand	-0.87
t_P Silt	0.87
Sand Silt	-0.98
Sand Clay	-0.87
Silt Clay	0.77

- In de correlatie matrix zien we dat basische kationen (de som van Ca, Mg, K) gecorreleerd is met calcium.
- Kalium en mangaan (totalen) zijn sterk gecorreleerd met zand (negatief) en silt of silt en klei.
- Kalium is negatief gecorreleerd aan de CN ratio

- Basenverzadiging is (maar niet >0.7) gecorreleerd met pH en basische kationen.
- Zand is sterk negatief gecorreleerd met silt en klei, het is niet nodig alle drie mee te nemen in verdere analyse. Gekozen wordt voor klei en siltfracties.

Vergelijking totaalgehalten en de zoutextracten 0-10cm

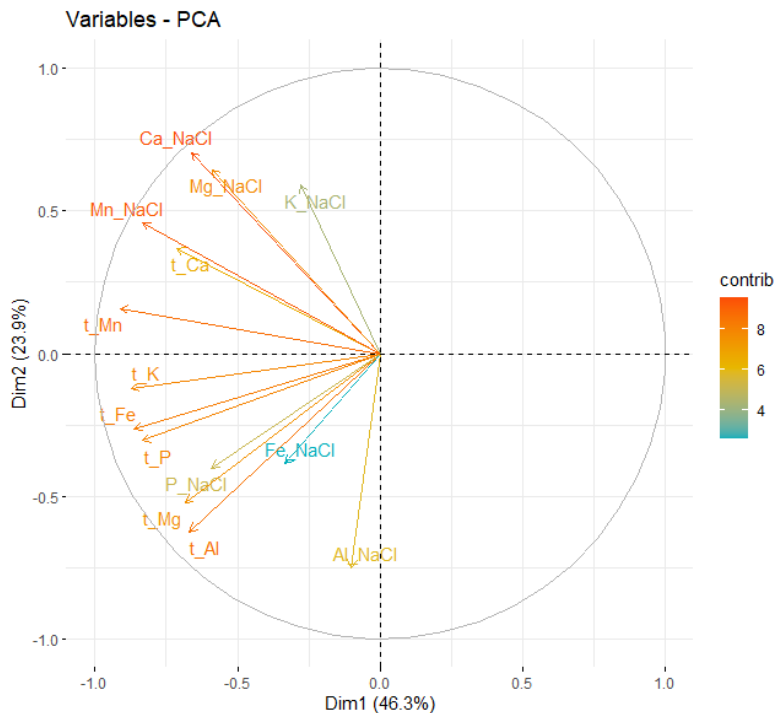
Wanneer we de totaalgehalten (uit destructies) en de data uit de zoutextracten in 1 analyse vergelijken kan men zien welke parameters meer verschillend zijn tussen de locaties en welke sterk gecorreleerd zijn (figuur B5). Een dergelijke vergelijking helpt ons met het kiezen van de juiste parameters voor eutrofie, verzuring/buffering en habitat in vervolgstappen.



Figuur B5. Correlatiematrix op basis van bodemchemie (0-10cm) destructies en zoutextracten (subset)

variabelen		Corr. Coefficient
t_Al	t_Mg	0.91
t_Ca	Ca_NaCl	0.75
t_Ca	Mg_NaCl	0.76
t_Fe	t_K	0.9
t_Fe	t_Mn	0.82
t_Fe	t_P	0.89
t_K	t_Mn	0.83
t_K	t_P	0.78
t_Mn	t_P	0.83
t_Mn	Mn_NaCl	0.87
Ca_NaCl	Mg_NaCl	0.94
Ca_NaCl	Mn_NaCl	0.88
Mg_NaCl	Mn_NaCl	0.78

In de correlatiematrix is te zien dat wanneer mangaan in de destructies hoog is, deze ook in het zoutextract hoog is. Dit geldt ook voor P en Ca. Multivariate analyse van de variabelen van het zoutextract en de destructies samen in een PCA tonen weinig verschil in de relatieve bijdrage aan de variatie (zie onderstaande PCA, figuur B6, de pijlen zijn ongeveer even lang).



Figuur B6. PCA van de bodemchemiegegevens (0-10cm totalen en zoutextracten) met de relatieve contributie van een subset van de variabelen

Wanneer we naar de bodemchemie kijken dan wordt verwacht dat zuurgraad (pH) tevens meetbaar kan zijn in het vrijkomen van aluminium. Dit meten we in het zoutextract en daarom wordt aluminium uit het zout extract geprefereerd boven totaal aluminium. Nutriëntenrijkdom (trofie) wordt grotendeels bepaald door stikstof en fosfor. Stikstof is alleen bepaald in het zoutextract. Fosfor is echter zowel in het zoutextract als in de destructies bepaald. De PCA toont dat totaal P iets meer differentiërend is en de verwachting is ook dat planten met mycorrhiza deze totale P voorraad kunnen aanspreken. Om deze reden nemen we totaal P in verdere analyse.

Verzuring / buffering wordt bepaald door de pH en de basische kationen en deze laatste zijn bepaald in beide extractiemethoden. Op individuele elementen zien we dat totaal calcium en calcium uit het zoutextract min of meer in eenzelfde richting wijzen en min of meer vergelijkbaar zijn in de relatieve bijdrage van de variantie. Dit geldt ook voor mangaan maar niet voor kalium en magnesium. De totalen van de bufferende kationen zijn sterk gecorreleerd met het percentage silt en/of klei en zowel het meenemen van de klei/silt fractie als de totalen van deze kationen kan leiden tot misinterpretatie. De vrij beschikbare kationen (uit het zoutextract) zijn veel minder gecorreleerd met zand/klei of silt. Gezien dat de buffering tot stand komt door uitwisselbare ionen en deze het toestaan om ook silt/klei en zand in de analyses te behouden wordt hier op grond van de biogeochemie gekozen voor de zoutextracten in de verdere analyse.

Samenvattend zoutextracten en totalen

In onderstaande tabel is weergegeven welke variabelen in vervolganalysen wel of niet worden meegenomen gebaseerd op bovenstaande selecties.

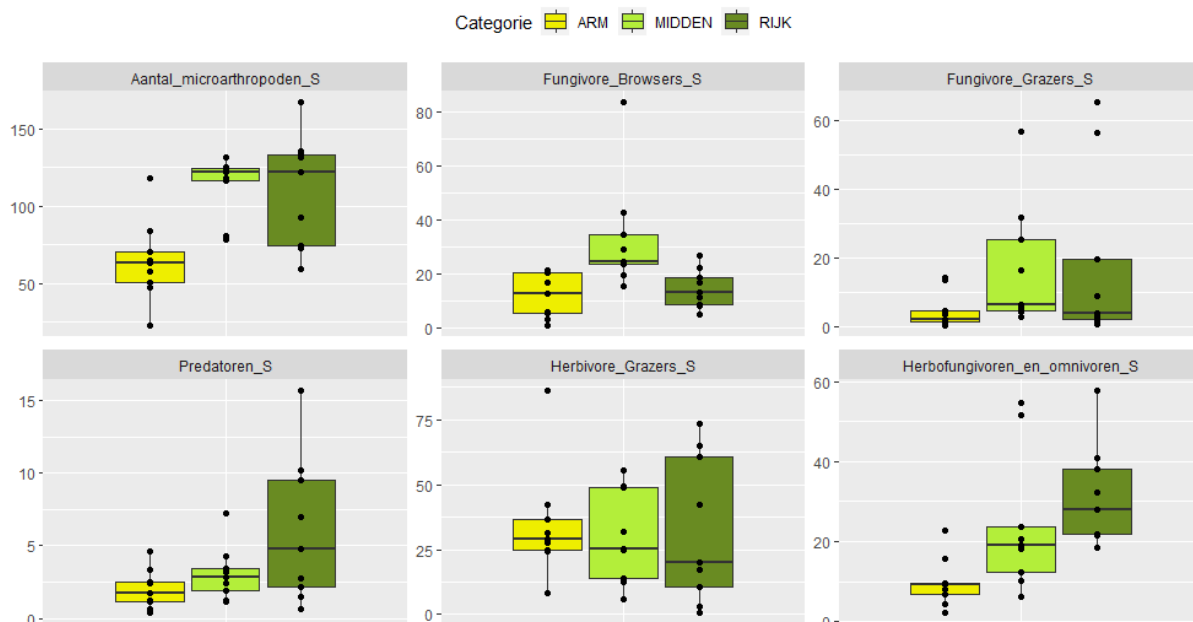
Indicator	variabelen
Zuurgraad	pH, Al (zout)
Buffering	Basenverzadiging (zout), basische kationen (zout) Mn (zout)
Eutrofie	NH4 (zout), NO3 (zout), P (totaal)
Habitat	Strooiseldikte, Organische stof gehalte, CN OL, OF, OS Silt, Klei

Bijlage 1.2 Boxplots van biota

De in het hoofddocument getoonde boxplots bevatten niet de Herbivore grazers in de strooisellaag en bodemlaag. Onderstaande boxplots bevatten deze wel.

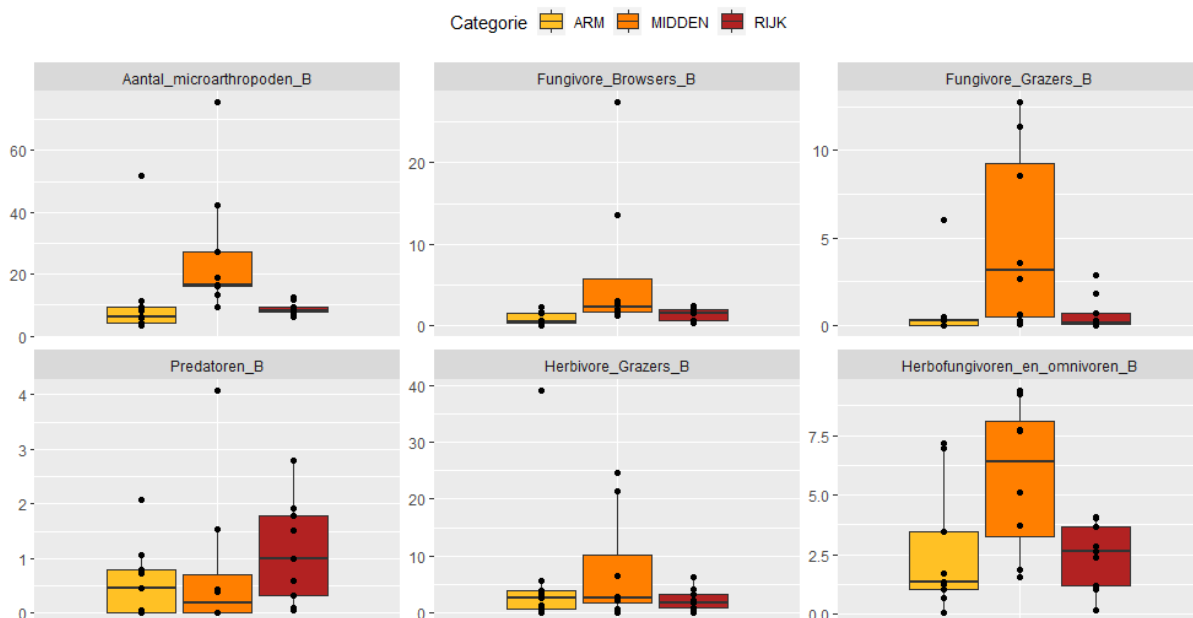
Bodembiota in de Strooisellaag

(aantal x 1000/m²)

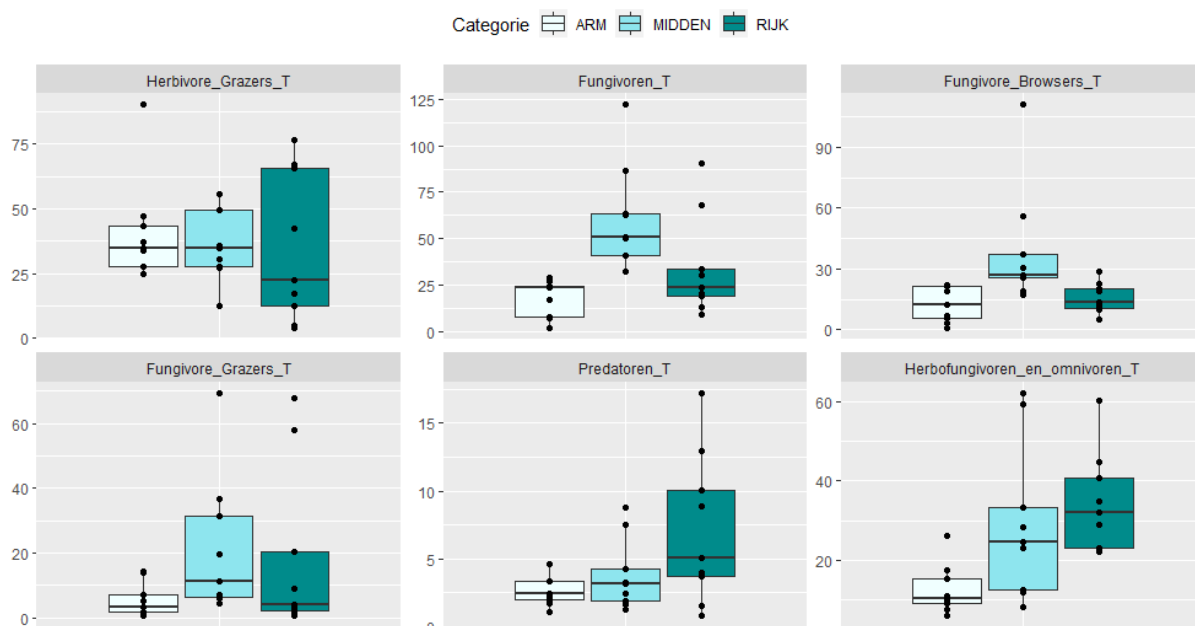


Bodembiota in de Bodemlaag

(aantal x 1000/m²)



Microarthropoden in de strooisel en bodemlaag (aantal x 1000/m²)



Bijlage 1.3 effectgroottes van de variabelen

Voor de variabelen uit de lineaire mixed modellen zijn ook effectgroottes berekend. Dit zijn de effecten van de betreffende variabele op de richtingscoëfficiënt van het gehele model. Omdat het een effect is op het gehele model (welke een multivariaat model is) zijn deze effectgroottes wat moeilijker te interpreteren en daardoor in deze bijlage opgenomen.

Tabel 4. Resultaten van de lme modellen voor biota in de bodemlaag. Getoond zijn de effect groottes van de verklarende milieuvariabelen. Significantieniveau: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal aantal microarthropoden	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen					-0.01*		
	basenverzadiging					0.19***		
Zuurgraad	pH					-4.38*		
	Al					0.01**		
Eutrofie	NH4							
	NO3							
	P		-0.71*					
Habitat	Organische stof							
	Strooiseldikte	-2.67***		-4.29***			-8.29***	
	Klei							
	Silt		0.33**					
	OF				0.64**			
	OL					0.38*		
	CN			1.84**			2.12**	

Tabel 5. Resultaten van de lme modellen voor biota in de strooisellaag. Getoond zijn de effect groottes van de verklarende milieuvariabelen. Significantieniveau: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal aantal microarthropoden	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen	-0.01***		-0.01**		-0.01**		
	basenverzadiging	1.16*						-0.39**
Zuurgraad	pH							
	Al						0.05***	
Eutrofie	NH4							
	NO3					0.02***		
	P							0.43*
	Mn			0.26*				
Habitat	Organische stof		4.31**					
	Strooiseldikte	-5.68**					-7.78**	-1.79**
	Klei			-5.58**		-0.32		

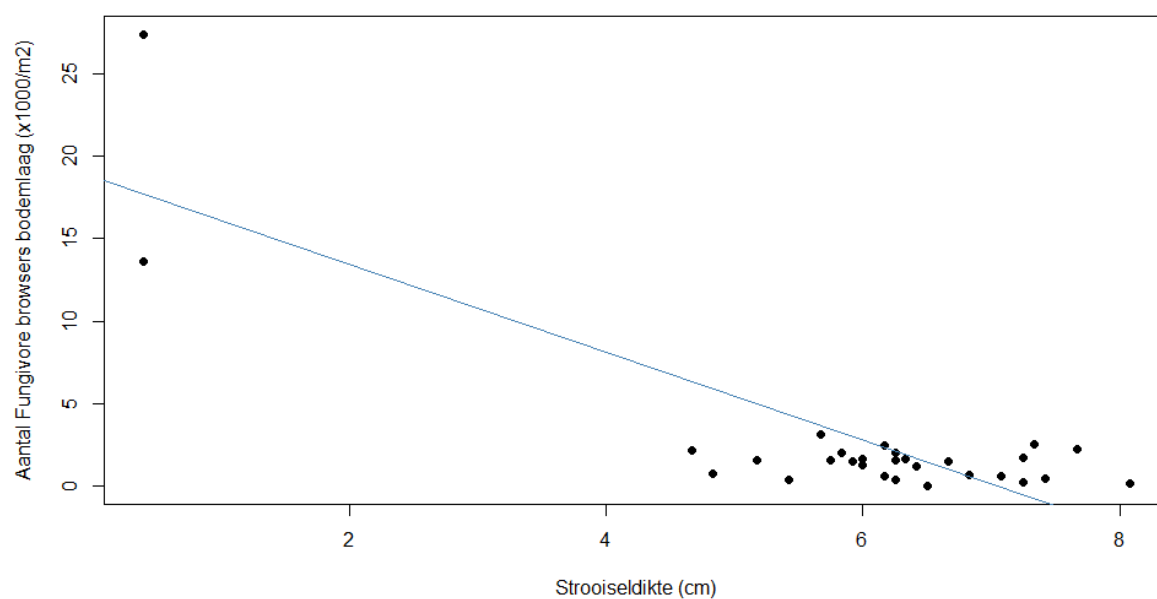
	Silt							
	OF	3.14**					4.18*	
	OL						-15.18**	-2.38**
	CN							

Tabel 6. Resultaten van de lme modellen voor biota in de beide lagen. Getoond zijn de effect groottes van de verklarende milieuvariabelen. Significantienniveau: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

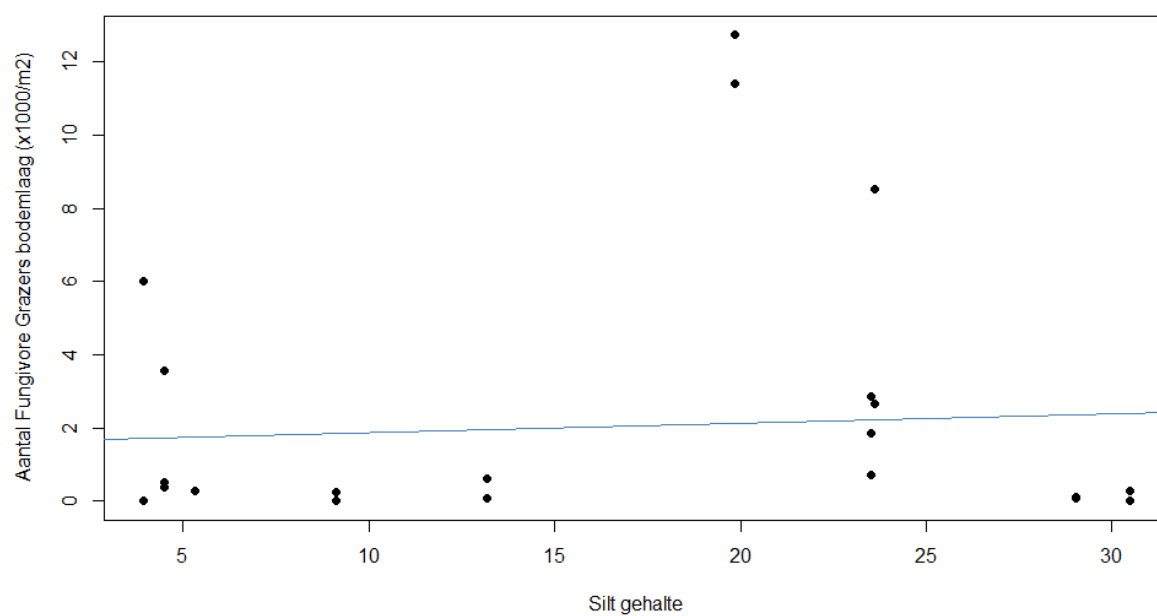
		Fungivore browsers	Fungivore grazers	herbivore grazers	omnivoren	predatoren	totaal Fungivoren	totaal aantal soorten
Buffering	basische kationen				-0.01***	-0.00***		
	basenverzadiging			-1.07*		0.30***	3.26**	
Zuurgraad	pH			77.53*	-63.01**		-160.85**	
	Al			0.04***	-0.03**		0.04*	0.04***
Eutrofie	NH4			0.03*				
	NO3				0.08**	0.02***	-0.12*	
	P					-0.74***		
	Mn			0.29***		0.06**		
Habitat	Organische stof		3.724*					
	Strooiseldikte	-8.879***			-7.81***	0.89**		-14.74***
	Klei					-1.64***		
	Silt					0.36***		
	OF			-2.23*	3.63***			5.35**
	OL			-15.67***				-15.01**
	CN			4.12**	-2.33*	-0.55***	-3.44	

Bijlage 1.4. Lineaire modellen

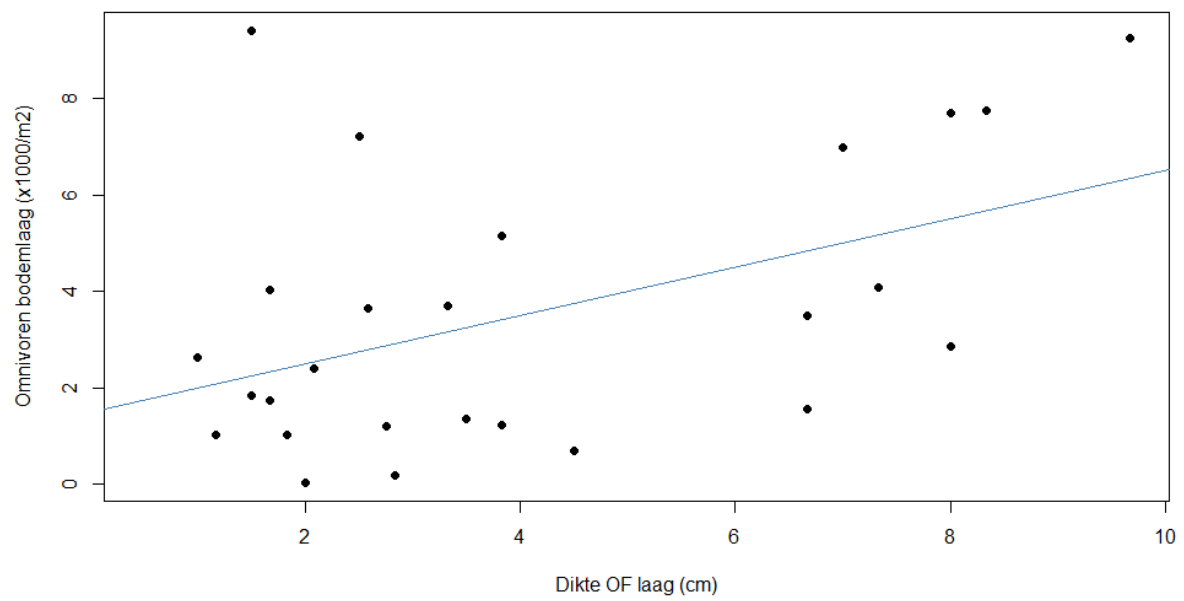
Aantal fungivore browsers bodemlaag



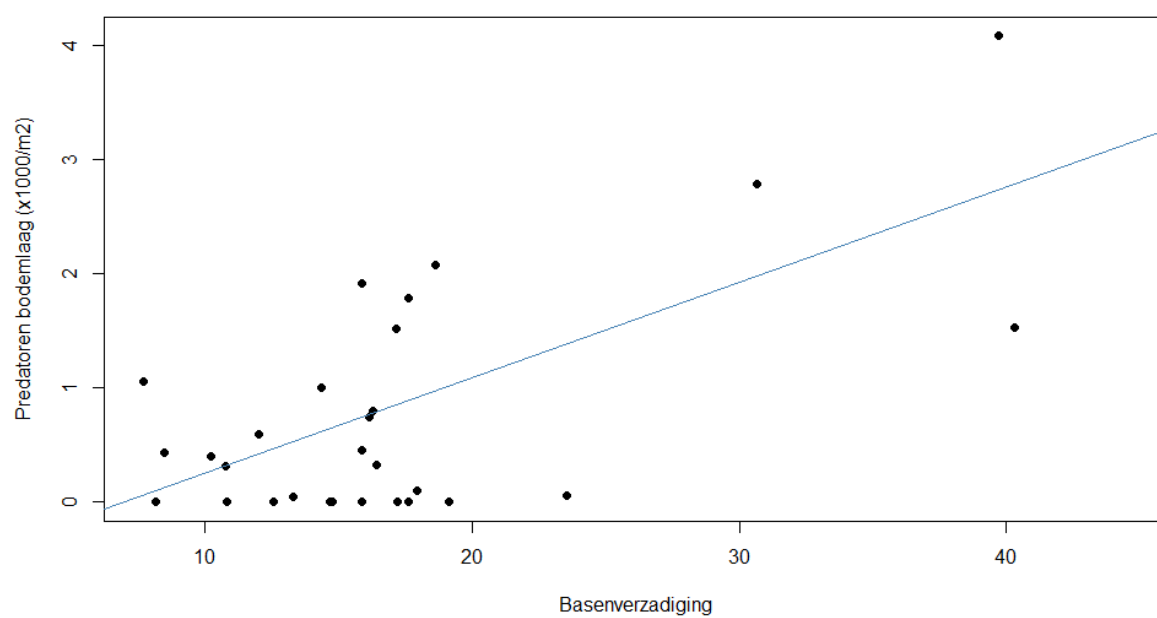
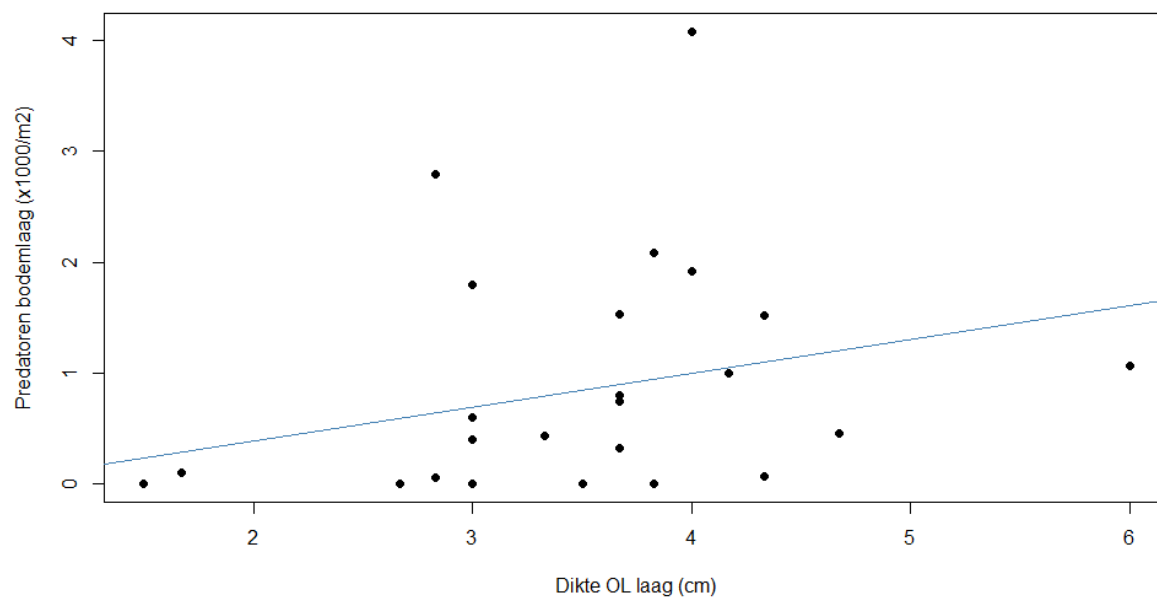
Aantal fungivore grazers bodemlaag



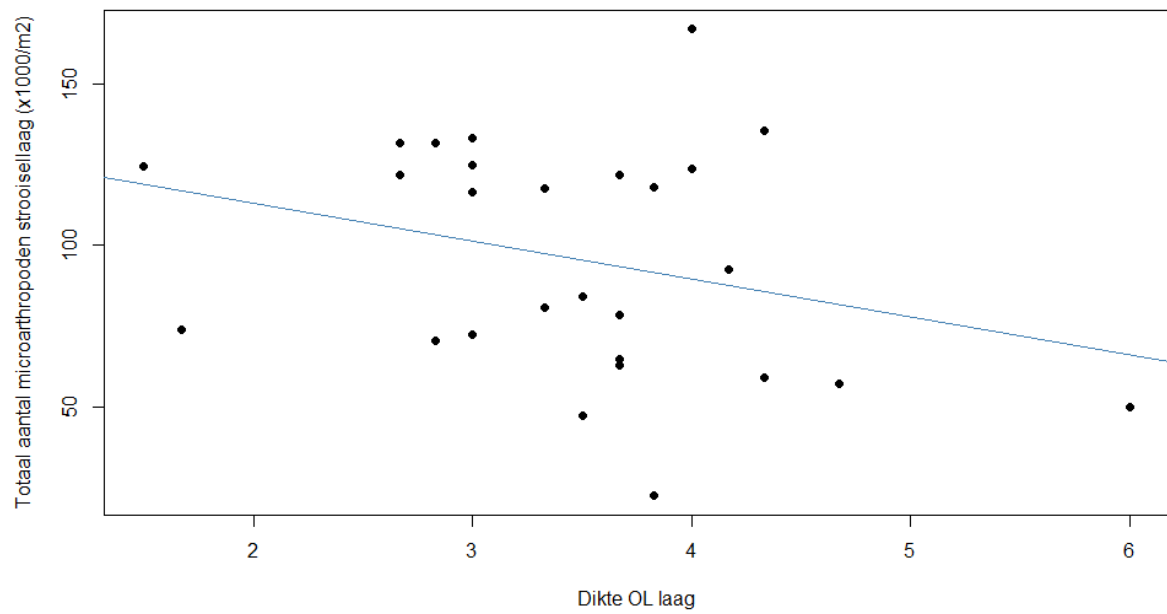
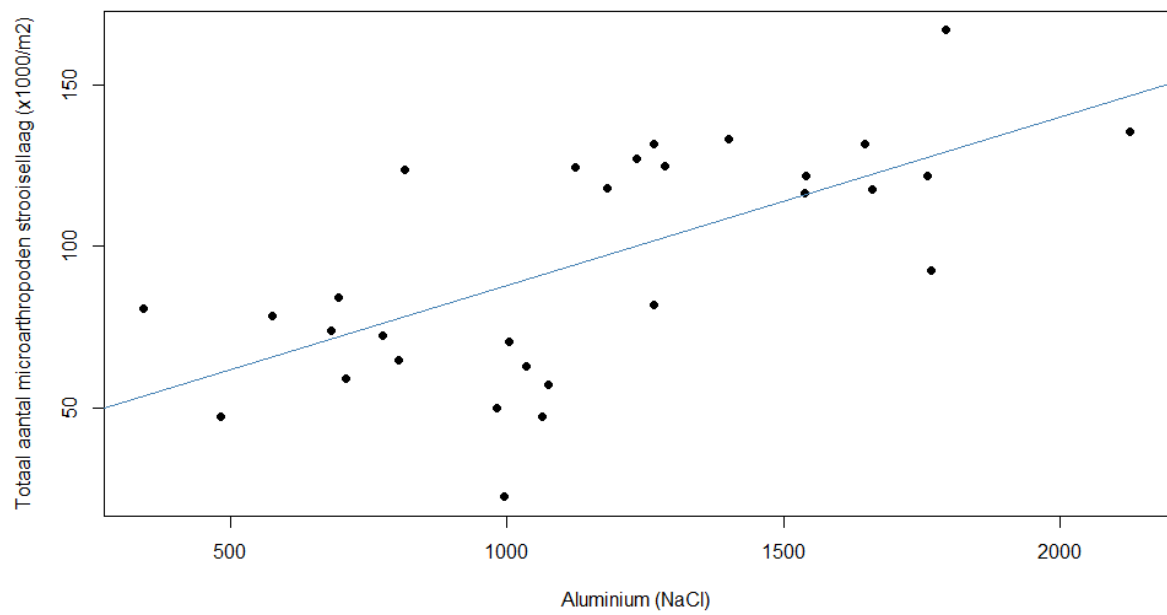
Aantal herbifungivoren en omnivoren bodemlaag



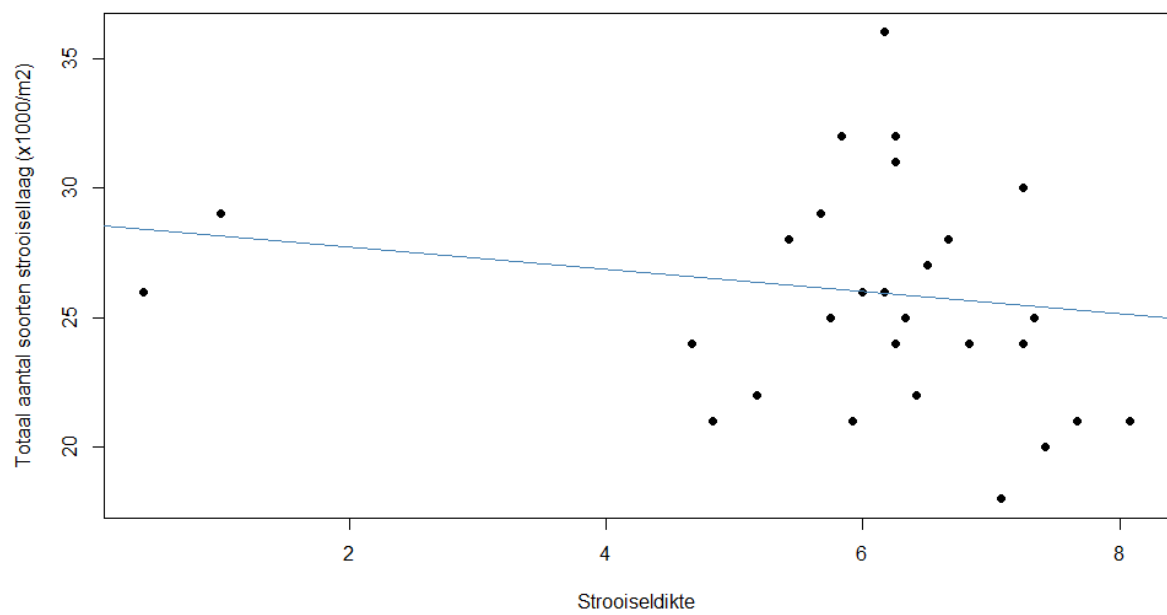
Aantal predatoren bodemlaag



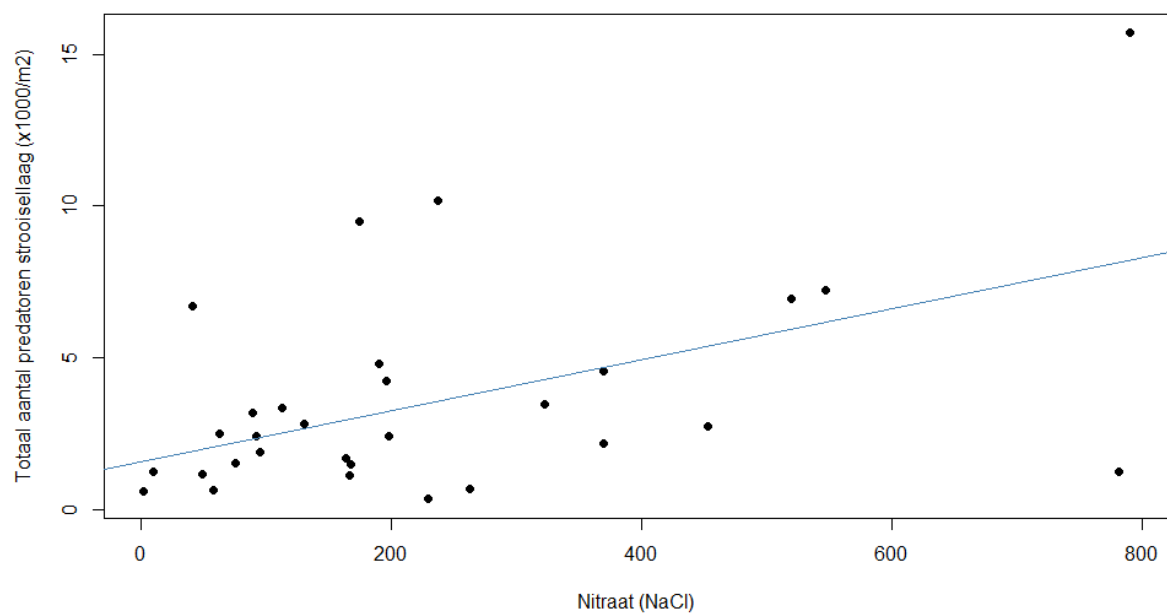
Aantal microarthropoden strooisellaag



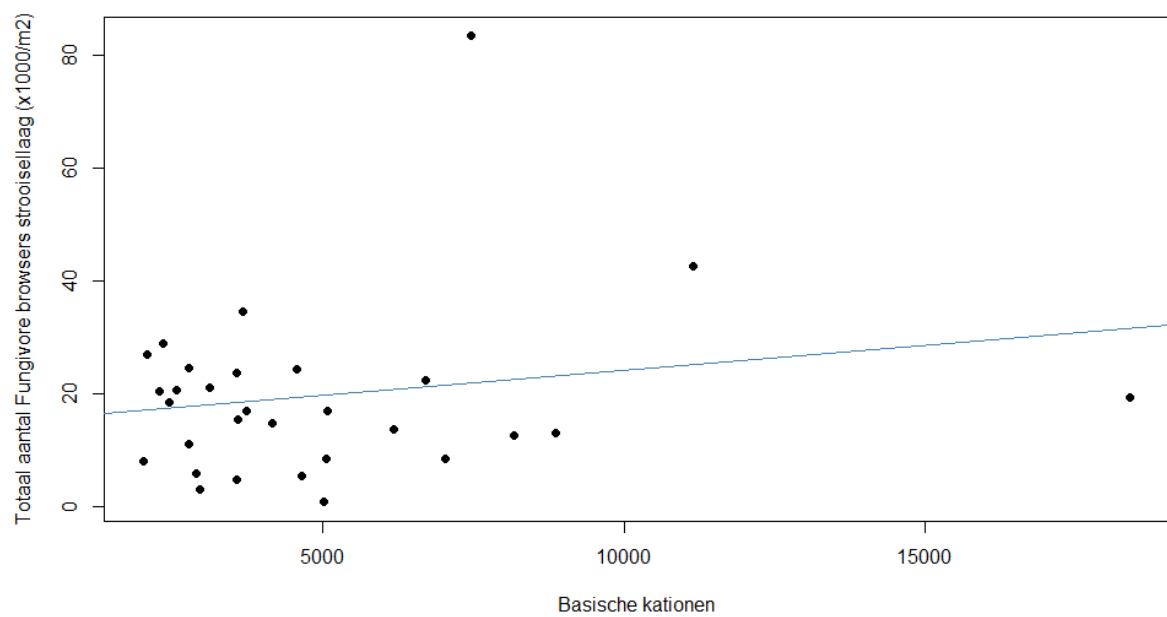
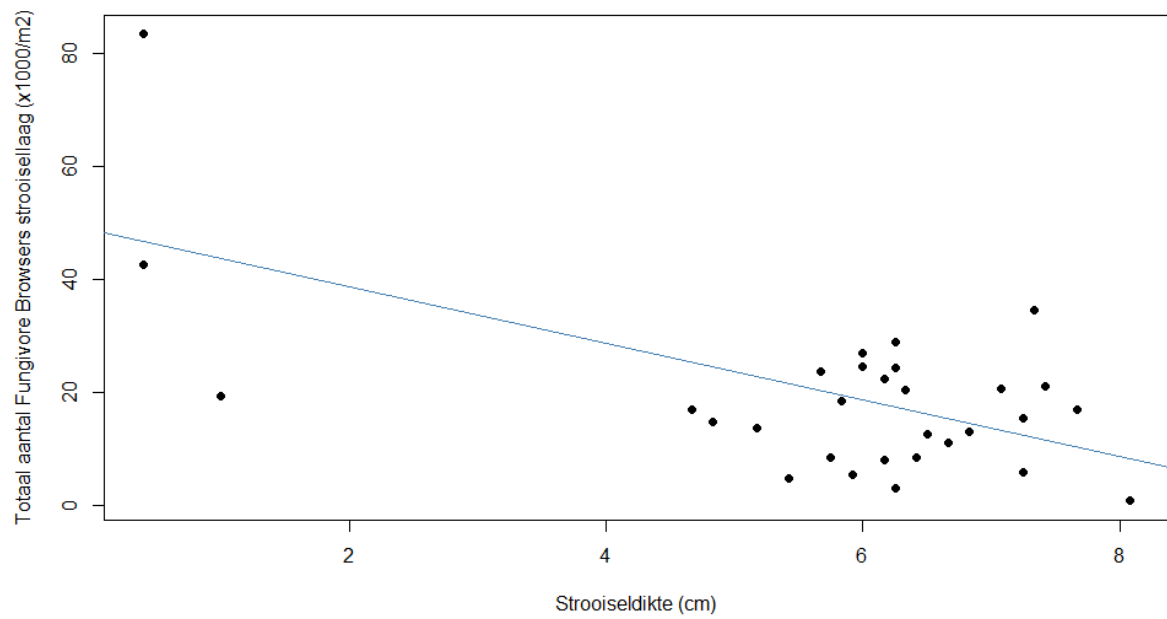
Totaal aantal soorten



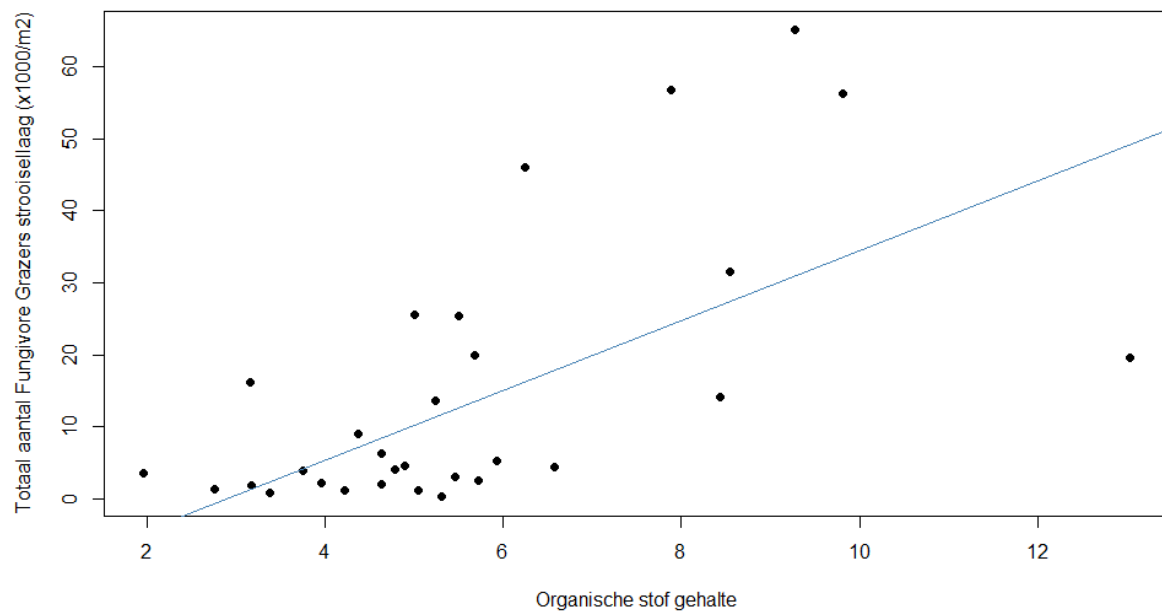
Aantal predatoren strooisellaag



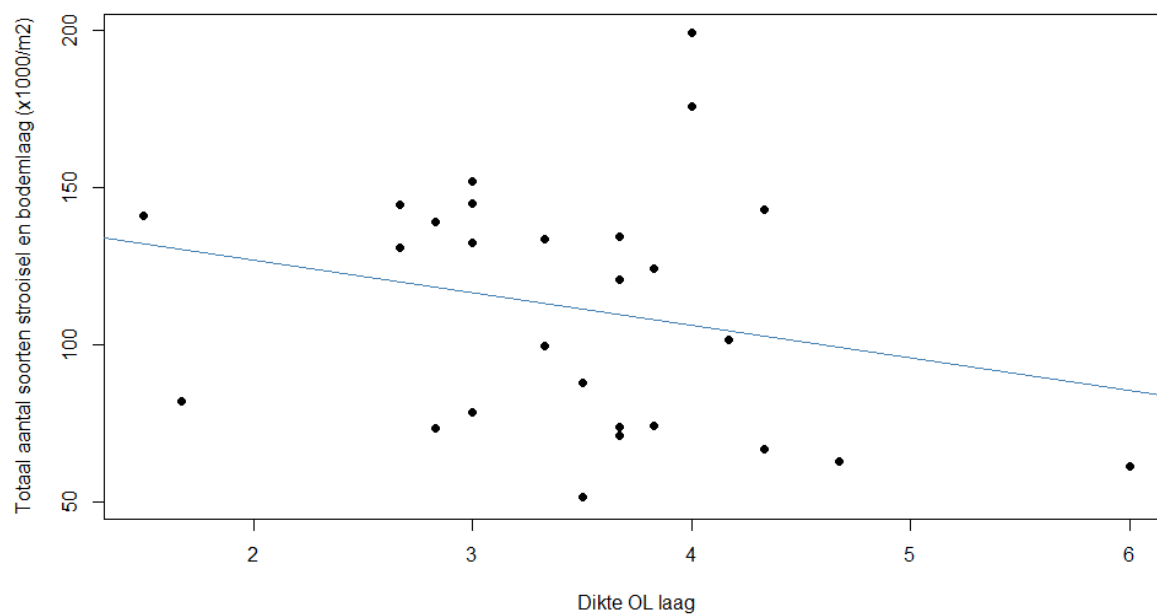
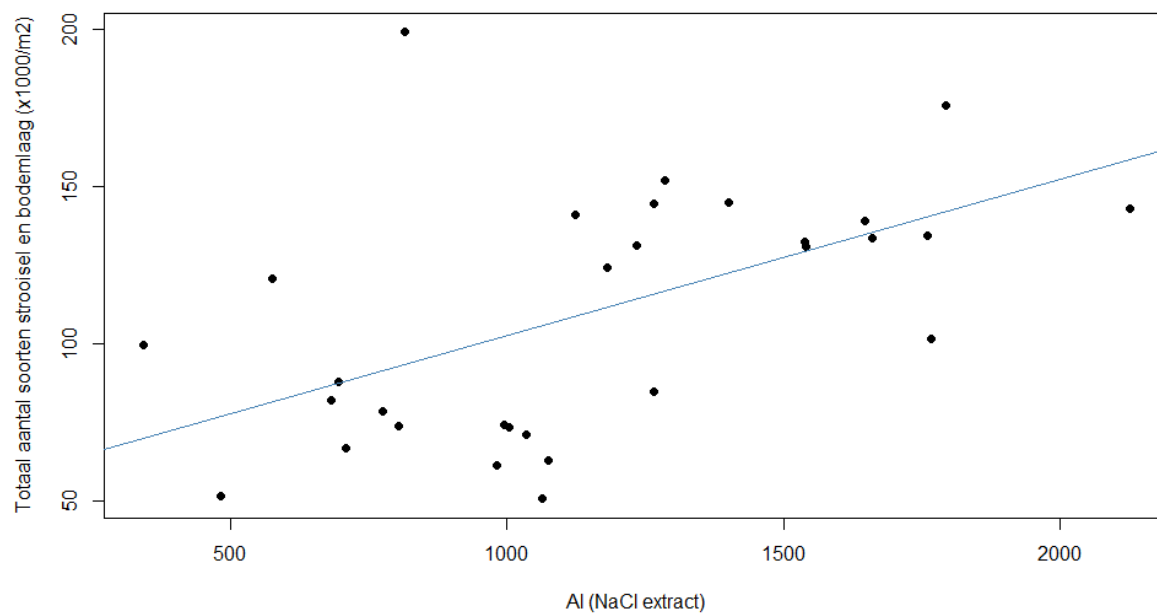
Aantal fungivore browsers strooisellaag



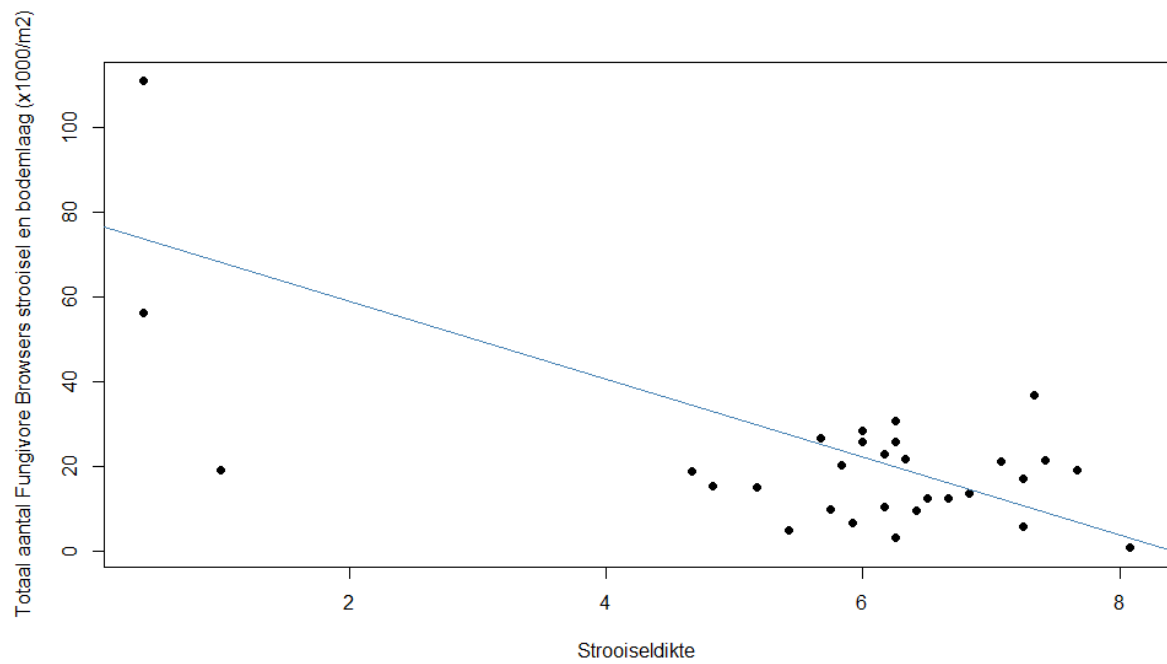
Totaal aantal fungivore grazers strooisellaag



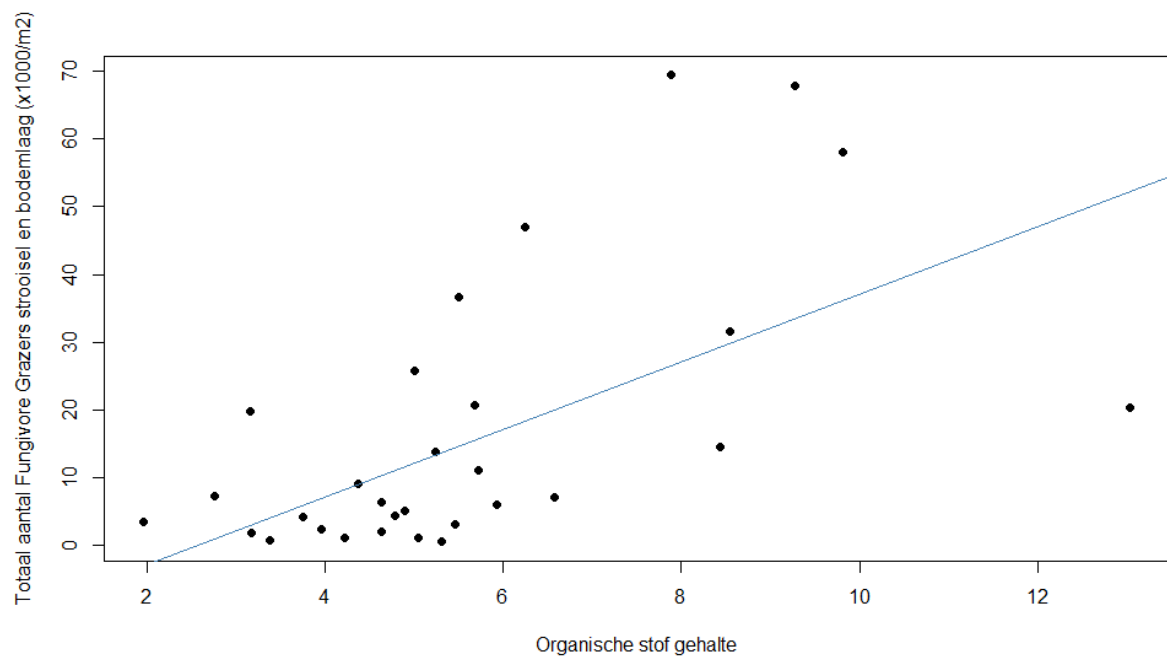
Totaal aantal soorten in beide lagen



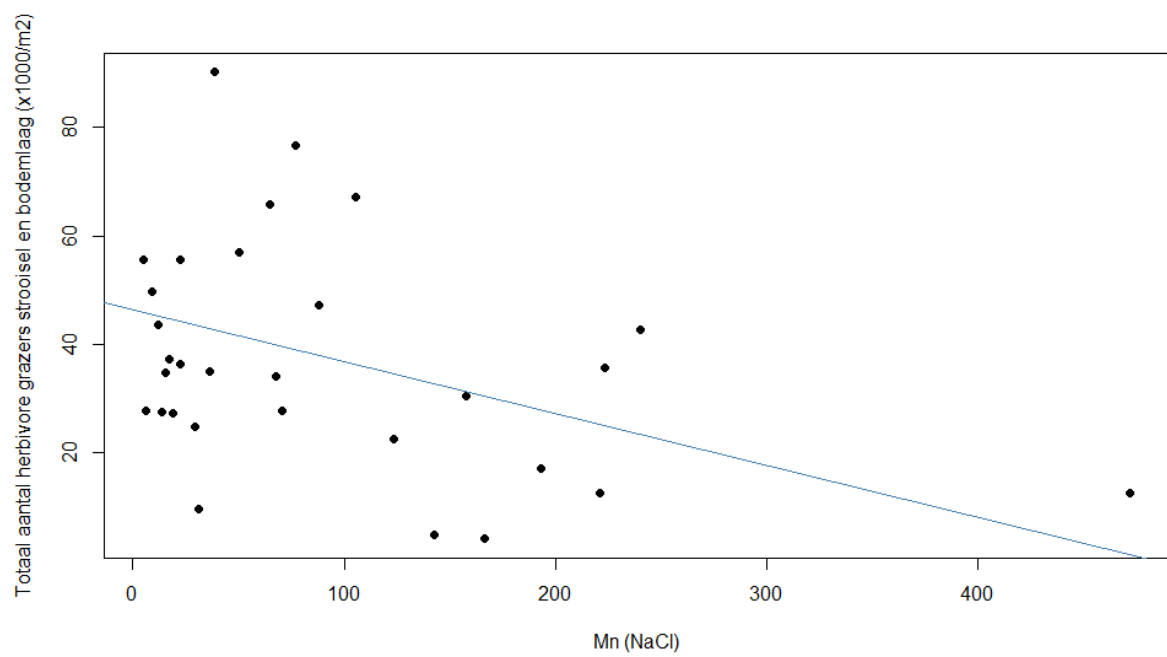
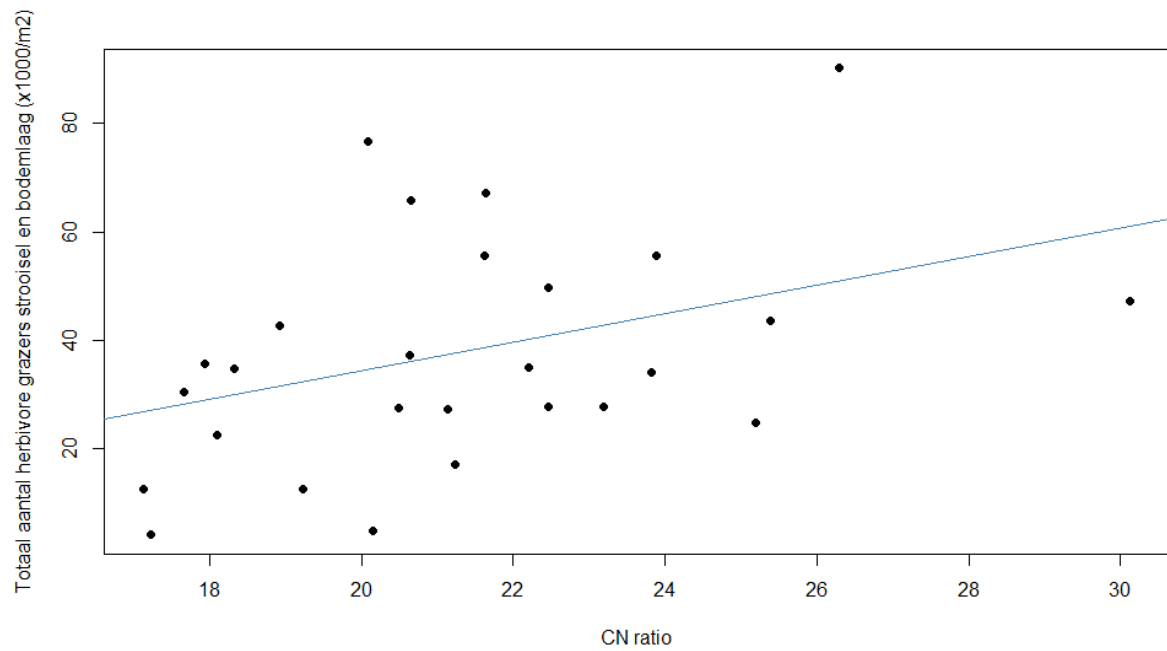
Totaal aantal fungivore browsers in beide lagen

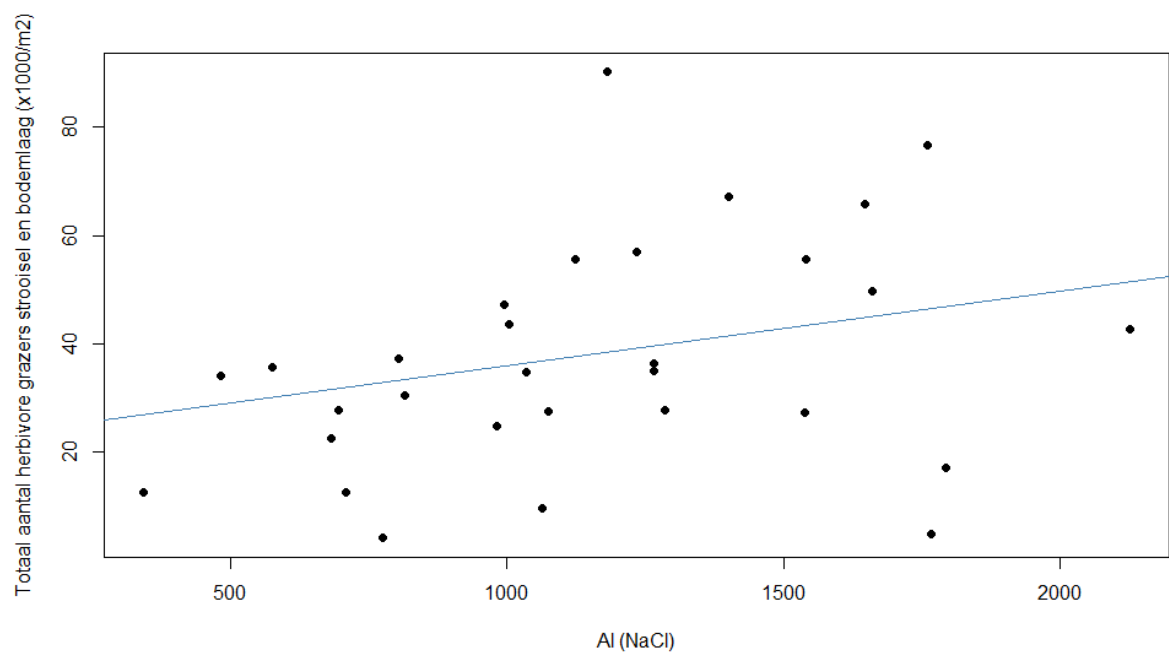
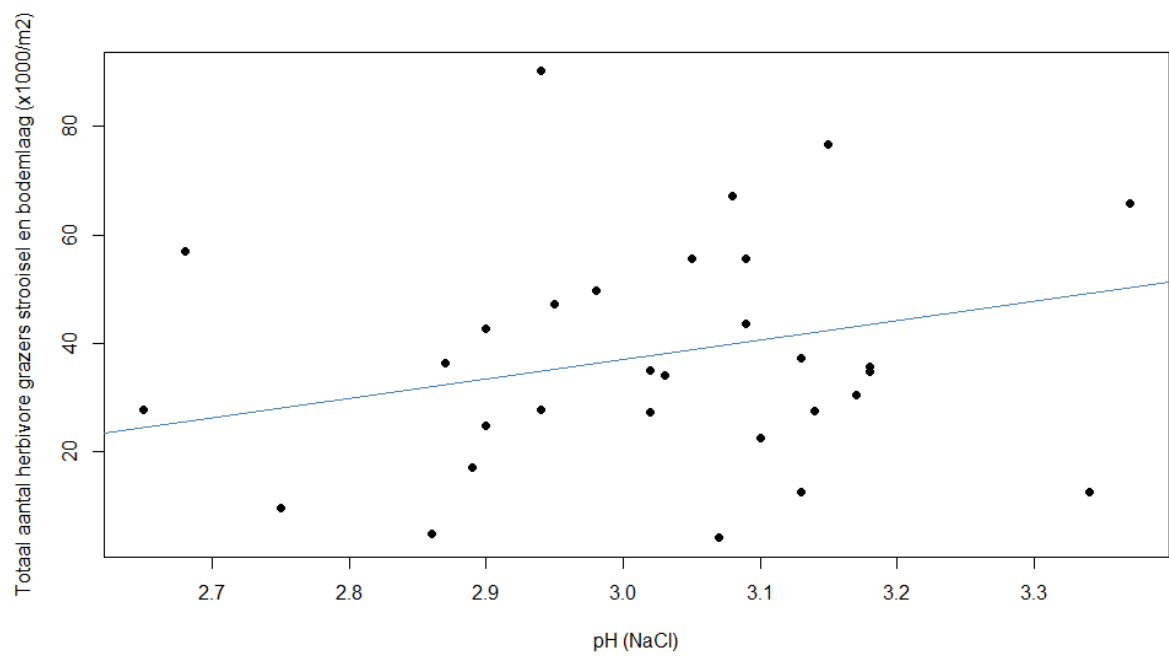


Totaal aantal fungivore grazers in beide lagen

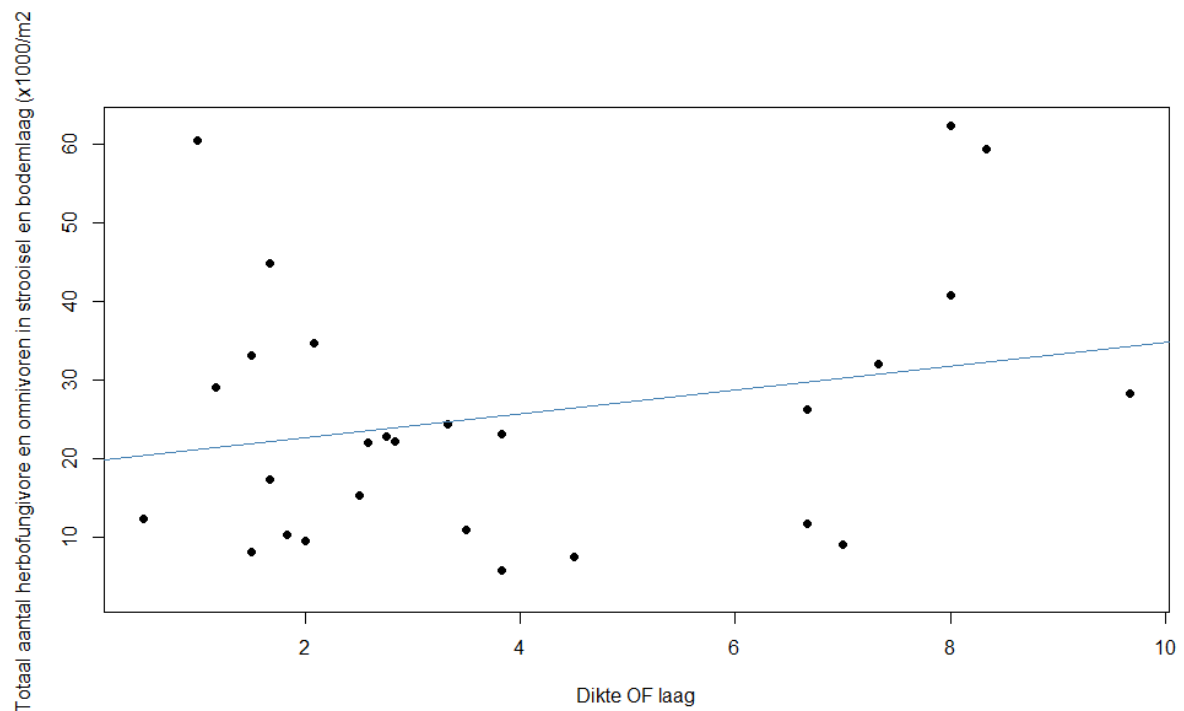


Aantal herbivore grazers in beide lagen

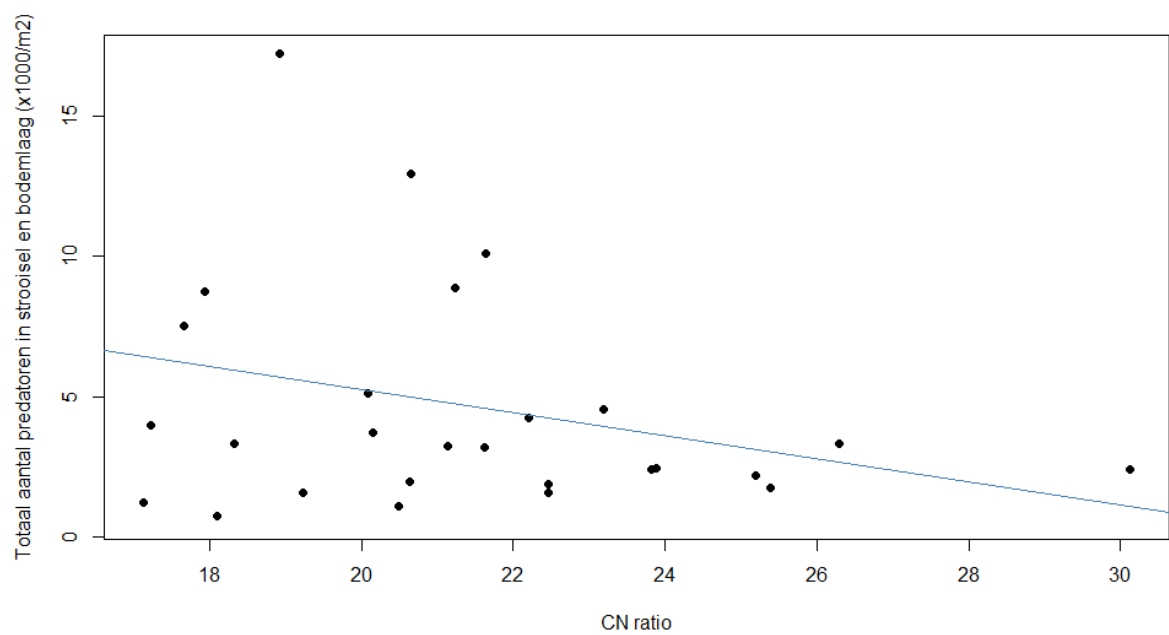


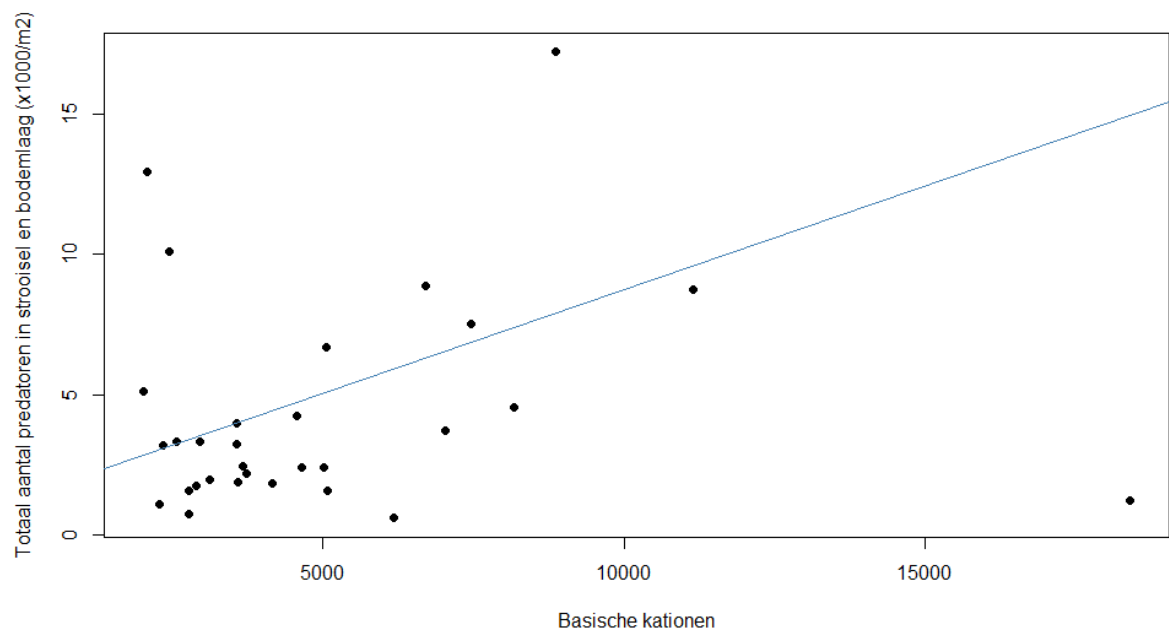
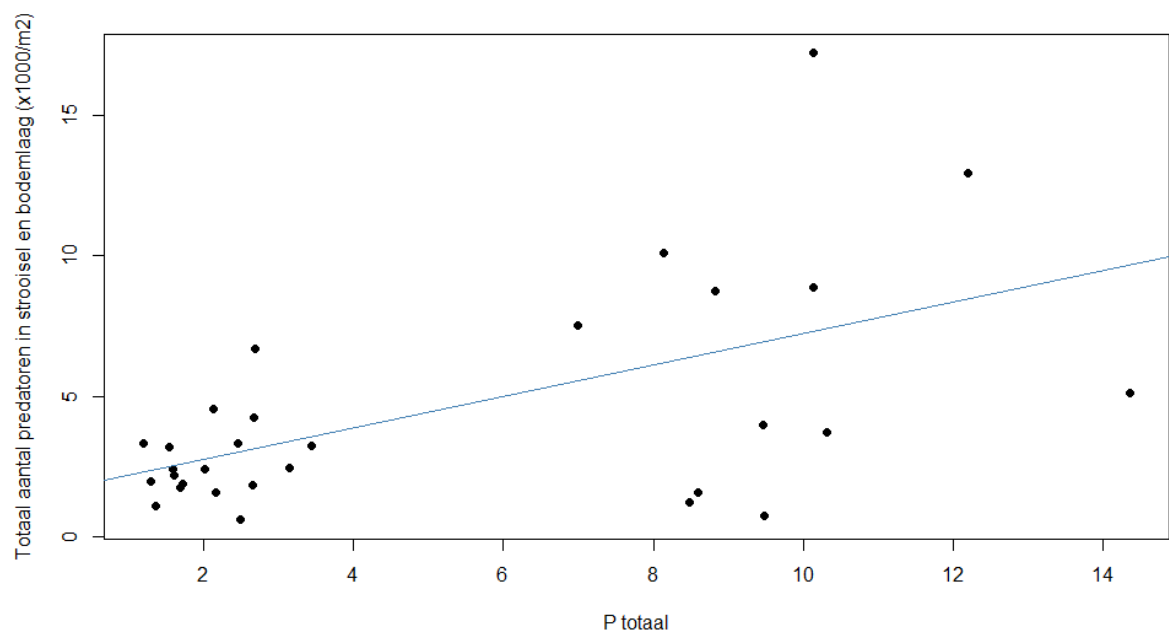


Aantal herbifungivoren en omnivoren in beide lagen

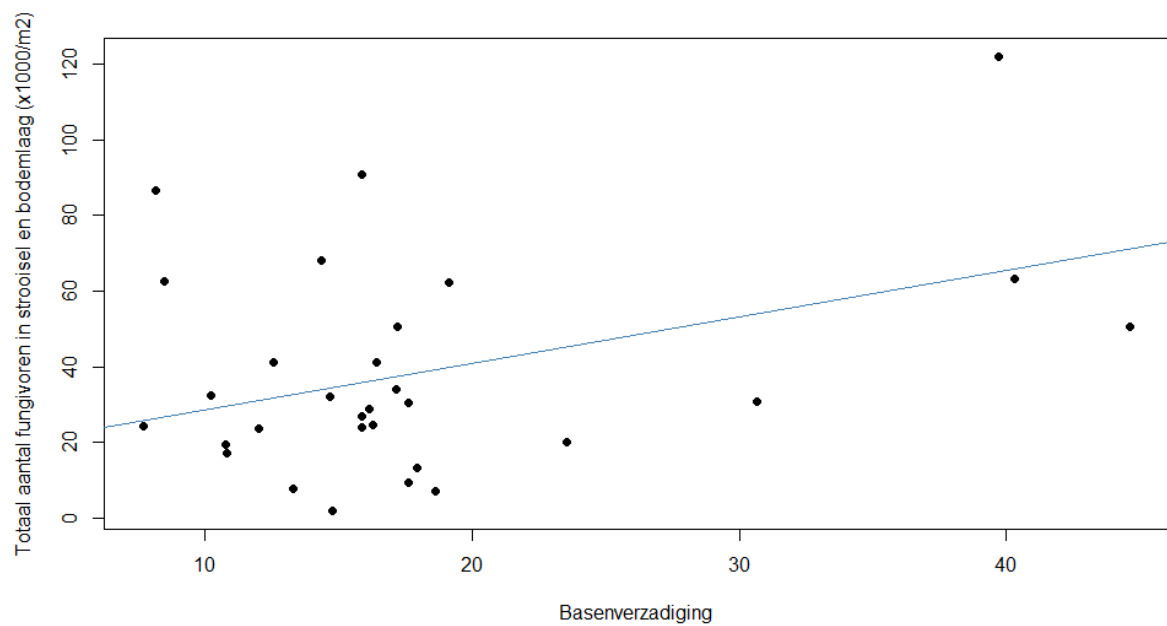
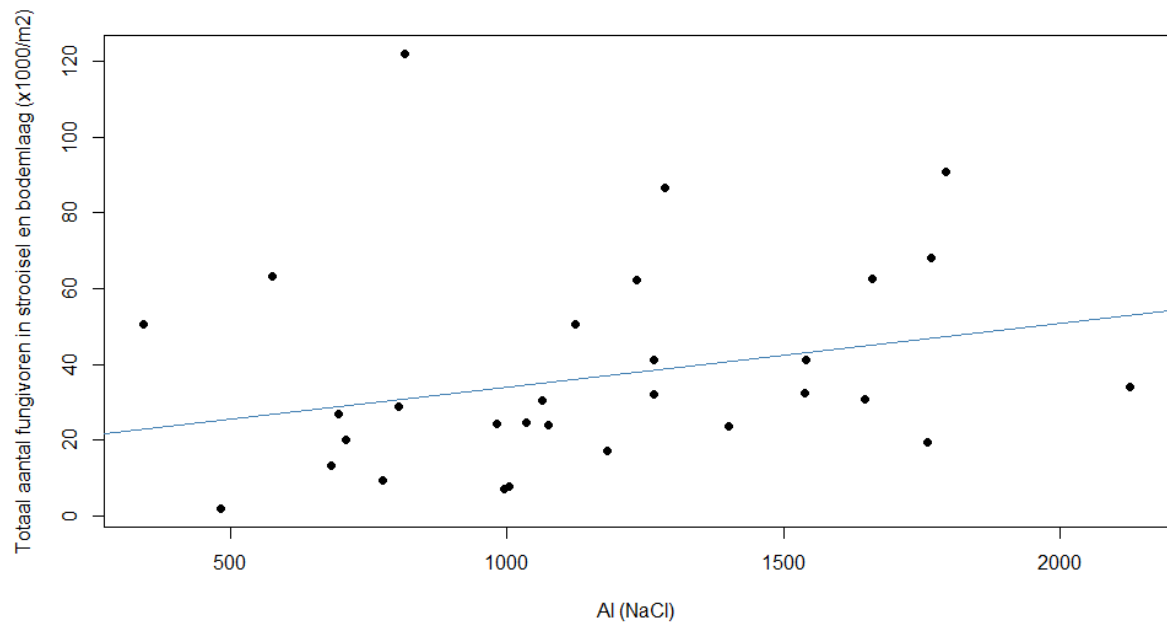


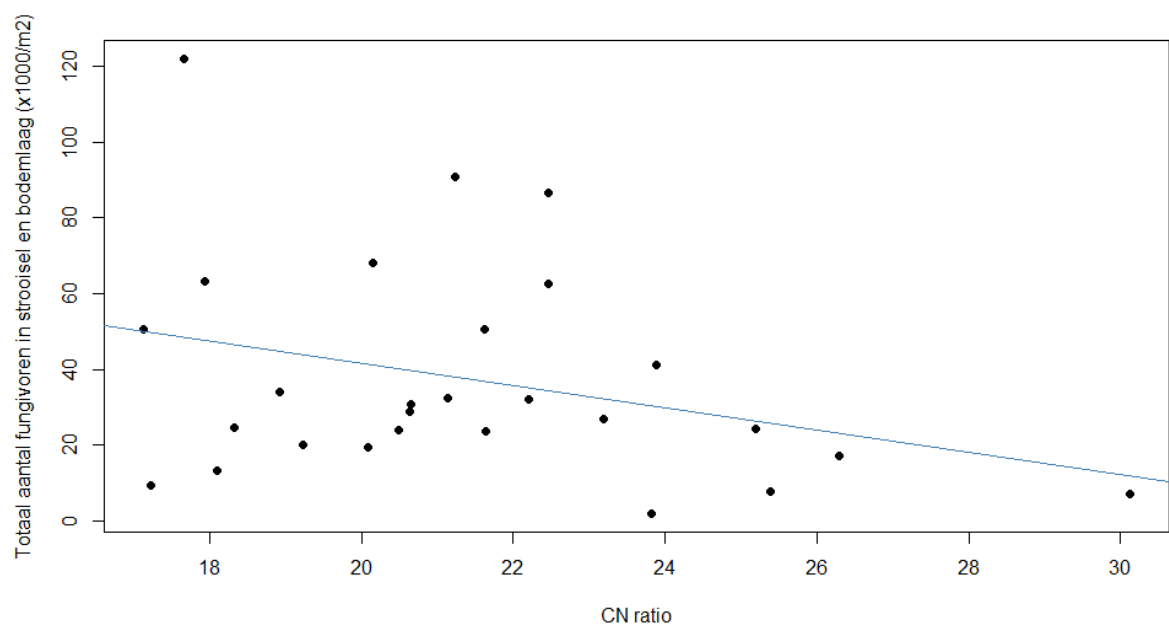
Aantal Predatoren in beide lagen





Aantal Fungivoren in beide lagen

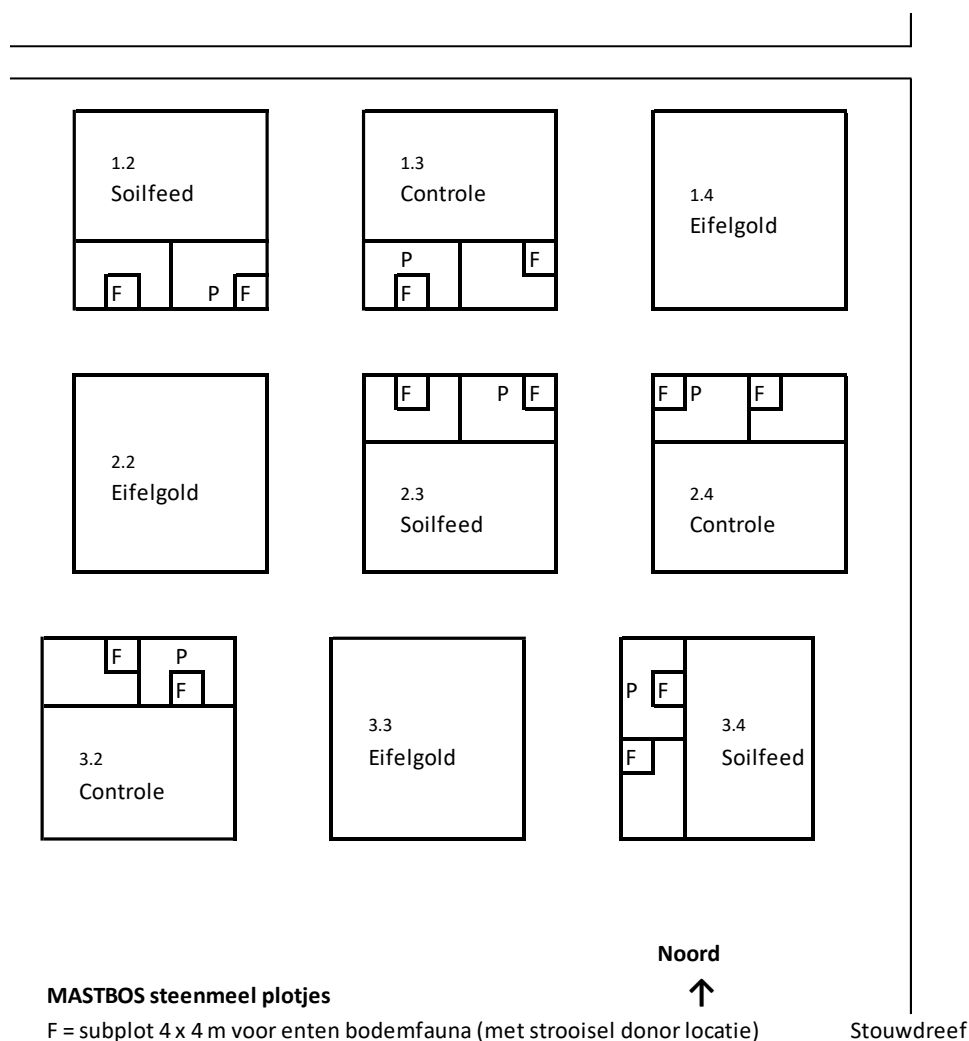


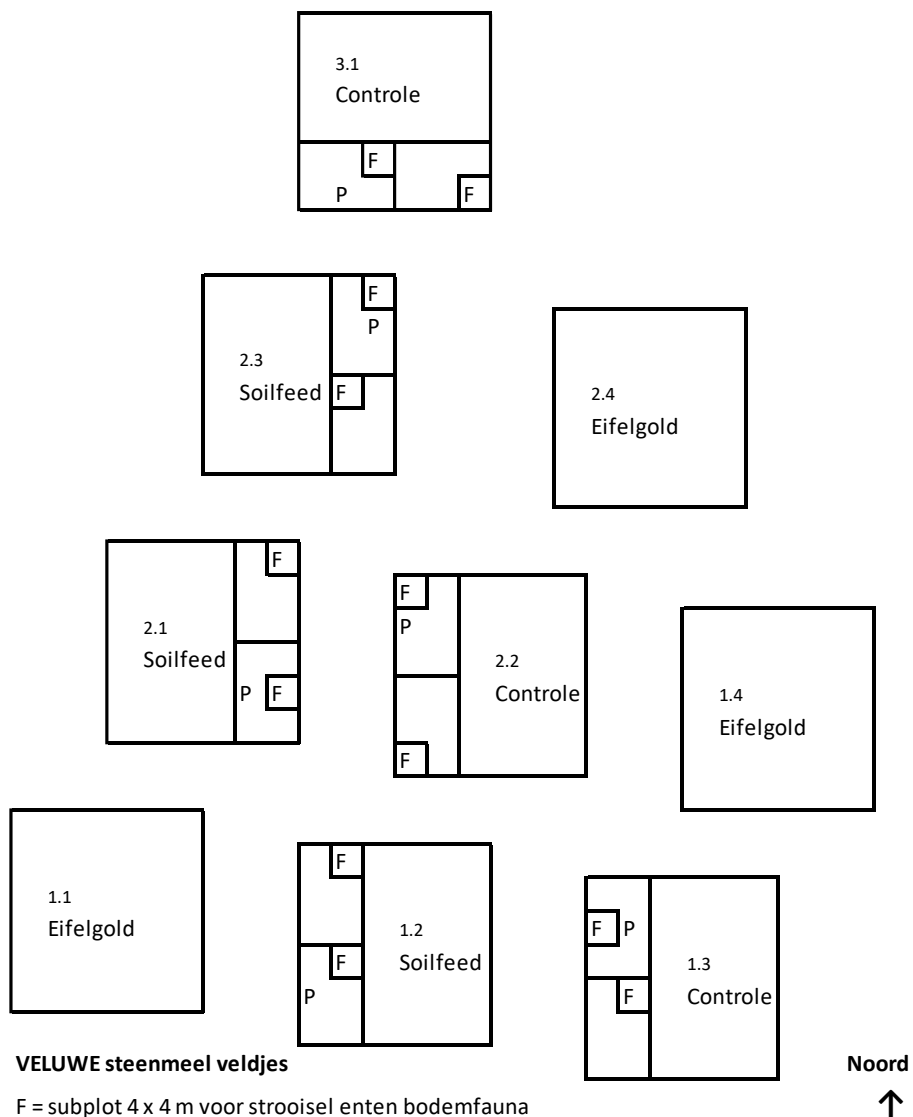


Bijlage 2. Schema proefveldjes

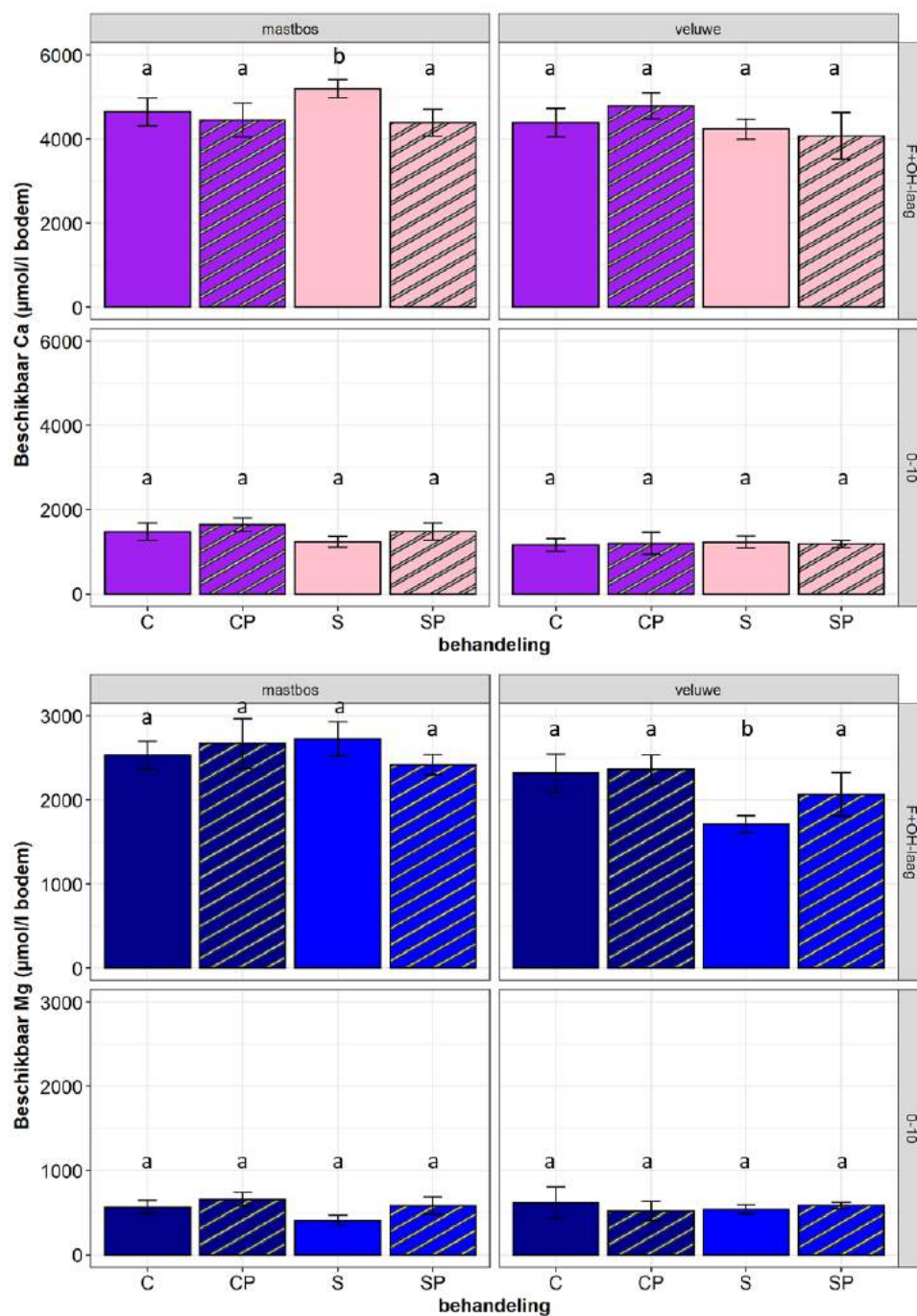
Schema van proefveldjes van de splitplot proef met toevoeging van P en bodemfauna (via strooisel van donor locatie) in de steenmeel experimenten in het Mastbos en op de Hoge Veluwe.

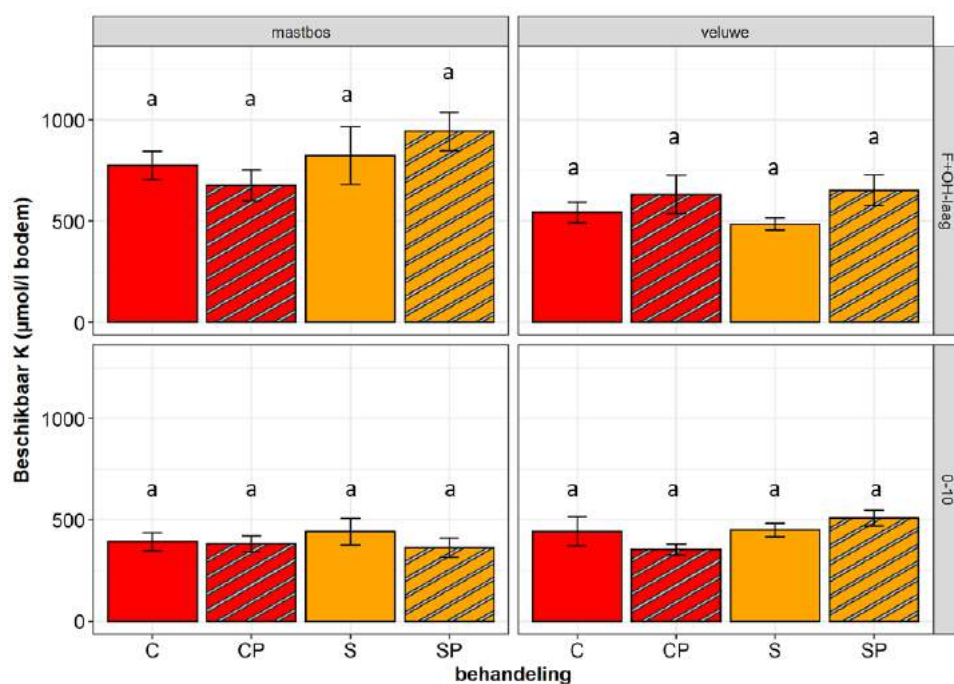
Layout of the split plot experiment with addition of P and soil fauna F (with litter from donor location) in the rock powder experiments in Mastbos and Hoge Veluwe.





Bijlage 3. Experimenten – Beschikbaar Ca, Mg, K

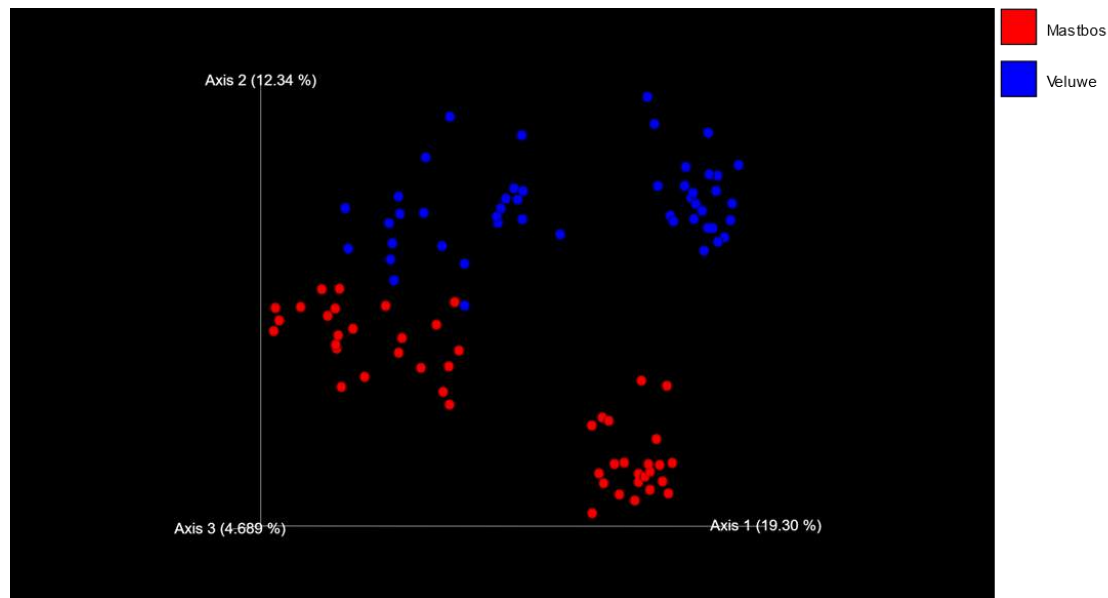




Figuur B 3.1. Beschikbare Ca-, Mg- en K-concentratie in $\mu\text{mol/l}$ bodem gemeten in de zomer van 2021 per behandeling. C=controle, P=P-toediening, S=steenmeeltoediening. Verschil in kleur geeft behandeling met steenmeel weer en arcering geeft P-behandeling weer. Gemiddelde $\pm$ st.fout, verschillende letters geven significant verschil t.o.v. controle weer ($p < 0,05$).

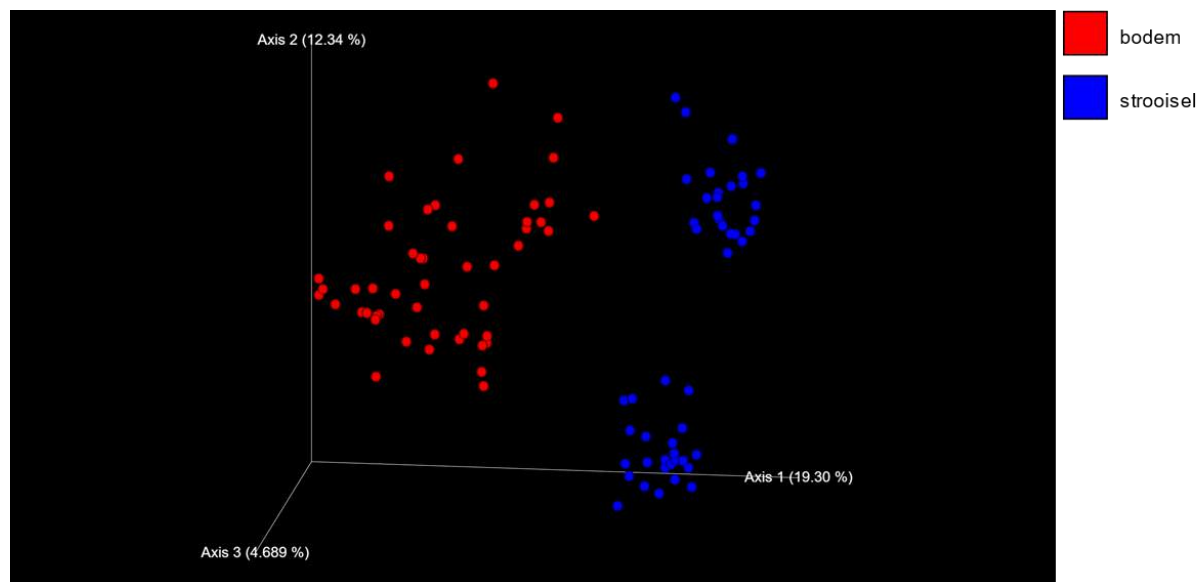
Figure B3.1. Available Ca-, Mg- and K-concentration in $\mu\text{mol/l}$ soil measured in a NaCl-extract in the summer of 2021 per treatment. C=control, P=P-addition and S=rock powder addition. Addition of rock powder represented with lighter colours and addition of P represented in stripes. Average $\pm$ standard error, different letters represent significant difference with control ($p < 0,05$).

Bijlage 4. Experimenten – PCA microarthropoden. Effecten locatie, bodemlaag en steenmeel.



Figuur B 4.1. PCA plot van de monsters op basis van aan- en afwezigheid van microarthropoden taxa. Effect van locatie, Mastbos (rood) en de Veluwe (blauw) **$P < 0.001$** .

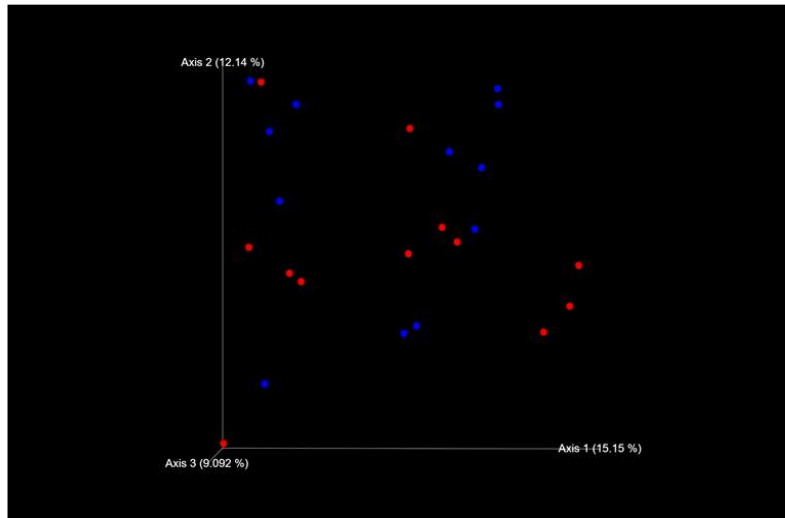
Figure B 4.1. PCA plot of the samples based on presence and absence of microarthropod taxa. Effect of location, Mastbos (red) and Veluwe (blue) **$P < 0.001$** .



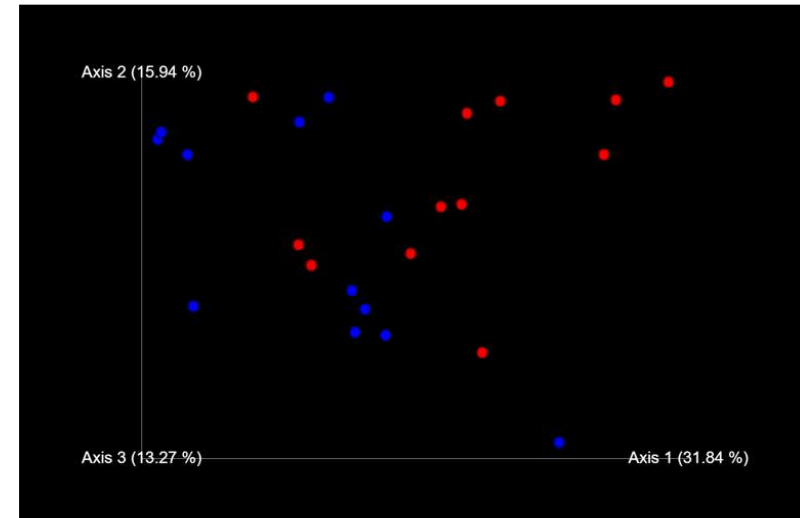
Figuur B 4.2. PCA plot van de monsters op basis van aan- en afwezigheid van microarthropoden taxa. Effect van bodemlaag, bodem (rood) en strooisel (blauw) $P < 0.001$.

Figure B 4.2. PCA plot of the samples based on presence and absence of microarthropod taxa. Effect of layer, mineral soil (red) and litter (blue) $P < 0.001$.

- Mastbos strooisel
unweighted



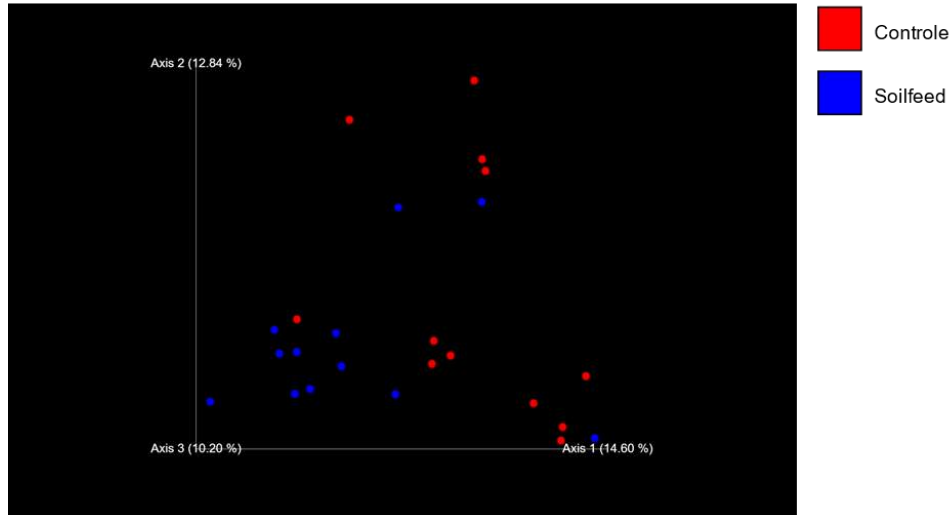
- Mastbos strooisel
weighted



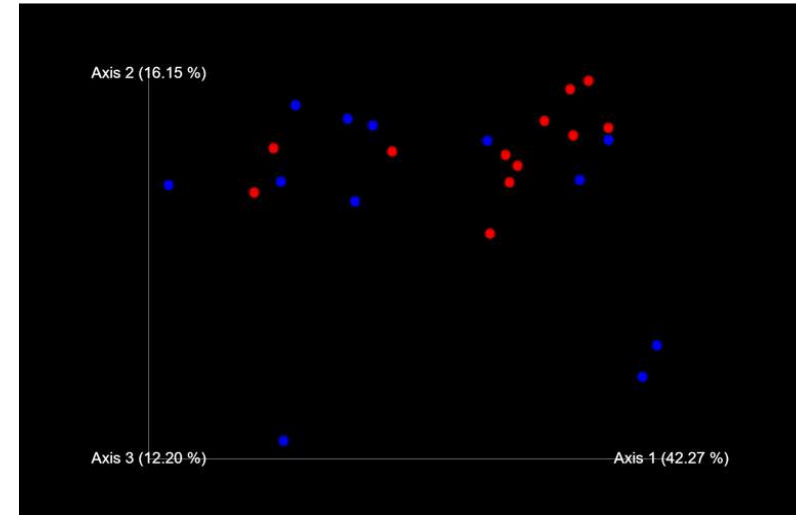
Figuur B 4.3. PCA plots van de monsters van Mastbos strooisel. Effect van steenmeel op basis van aan- en afwezigheid (unweighted, $P=0.165$ n.s.) en op basis van relatieve abundanties van microarthropoden taxa (weighted, $P=0.005$).

Figure B 4.3. PCA plots of the samples of the Mastbos litter layer. Effect of rock powder based on presence and absence (unweighted, $P=0.165$ n.s.) and based on relative abundances of microarthropod taxa (weighted, $P=0.005$).

- Mastbos bodem
unweighted



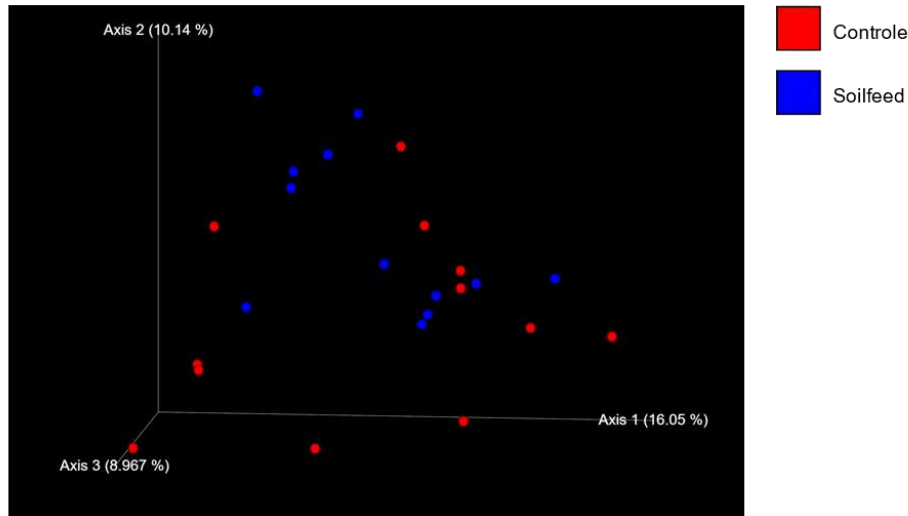
- Mastbos bodem
weighted



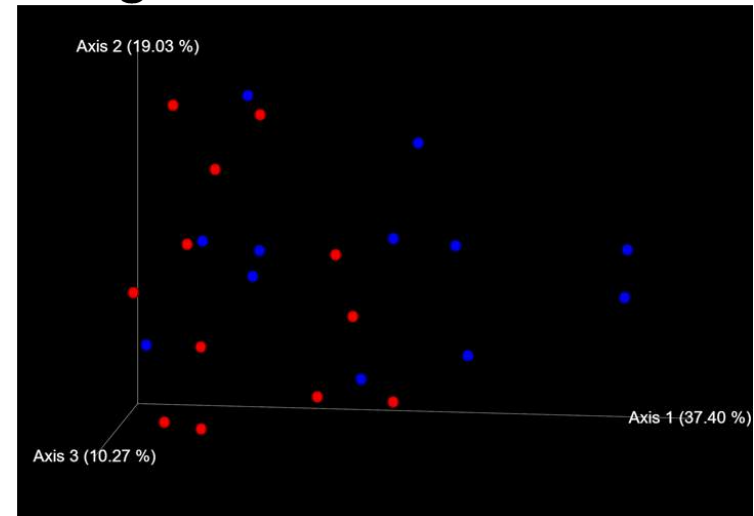
Figuur B 4.4. PCA plots van de monsters van Mastbos bodem. Effect van steenmeel op basis van aan- en afwezigheid (unweighted, **$P=0.01$**) en op basis van relatieve abundanties van microarthropoden taxa (weighted, $P=0.224$ n.s.).

Figure B 4.4. PCA plots of the samples of the Mastbos mineral soil layer. Effect of rock powder based on presence and absence (unweighted, $P=0.165$ n.s.) and based on relative abundances of microarthropod taxa (weighted, **$P=0.005$**).

- Veluwe strooisel -
unweighted



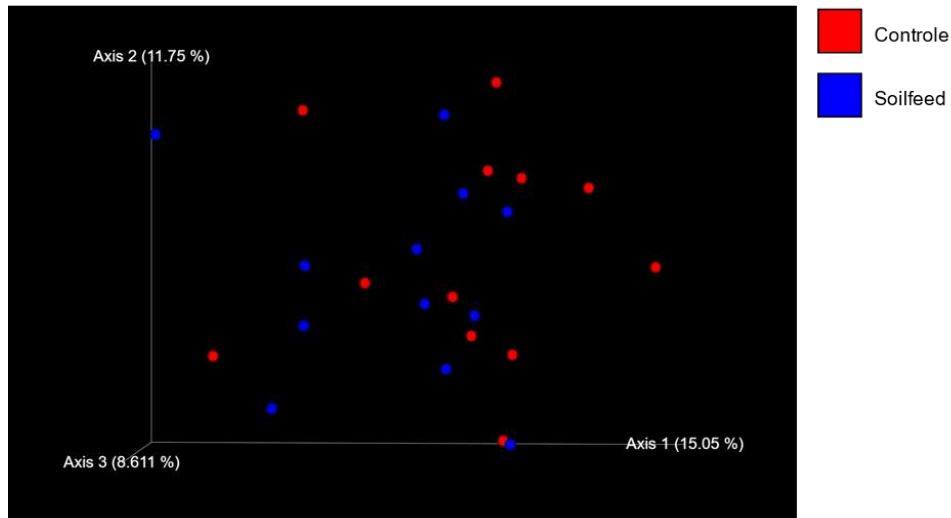
- Veluwe strooisel -
weighted



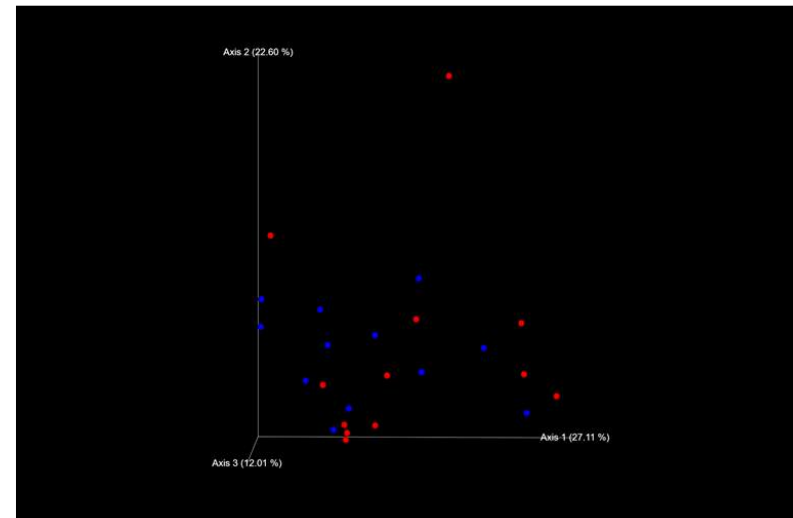
Figuur B 4.5. PCA plots van de monsters van de Veluwe strooisellaag. Effect van steenmeel op basis van aan- en afwezigheid (unweighted, $P=0.098$) en op basis van relatieve abundanties van microarthropoden taxa (weighted, $P=0.02$).

Figure B 4.5. PCA plots of the samples of the Veluwe litter layer. Effect of rock powder based on presence and absence (unweighted, $P=0.098$) and based on relative abundances of microarthropod taxa (weighted, $P=0.02$).

- Veluwe bodem
unweighted



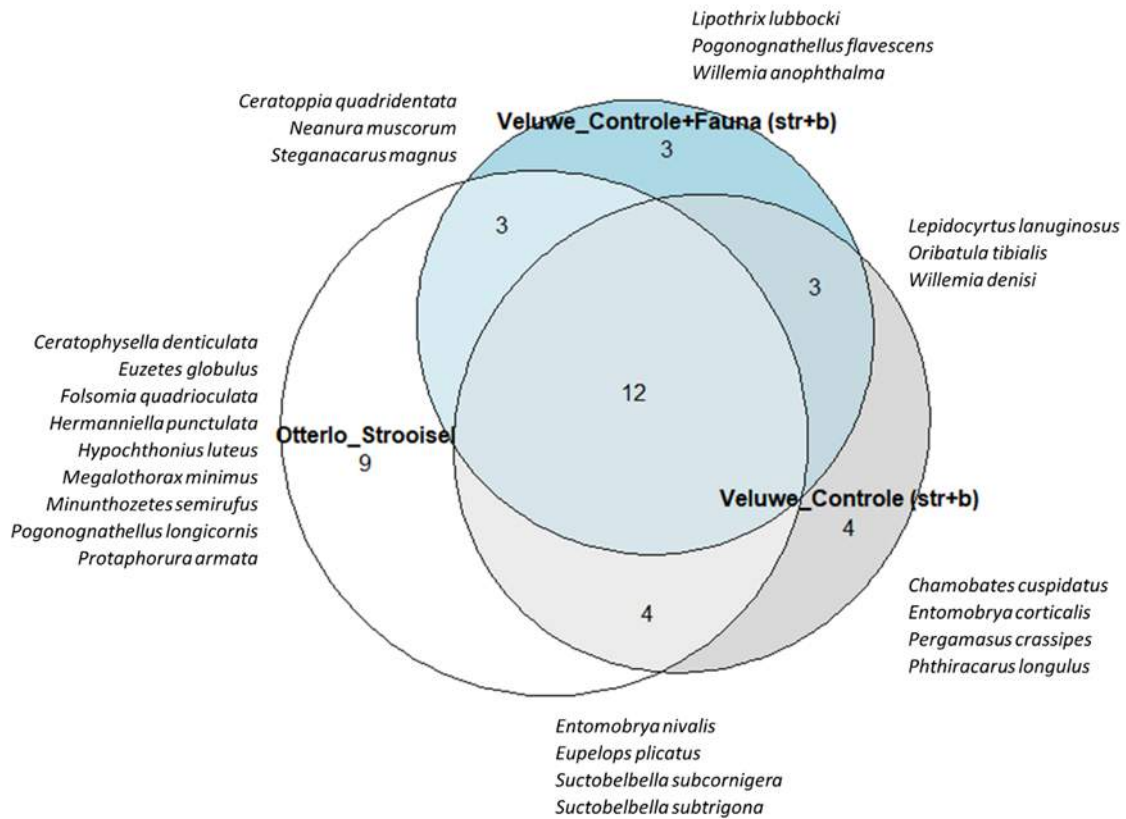
- Veluwe bodem
weighted



Figuur B 4.6. PCA plots van de monsters van de Veluwe minerale bodem. Effect van steenmeel op basis van aan- en afwezigheid (unweighted, $P=0.19$ n.s.) en op basis van relatieve abundanties van microarthropoden taxa (weighted, $P=0.175$ n.s.).

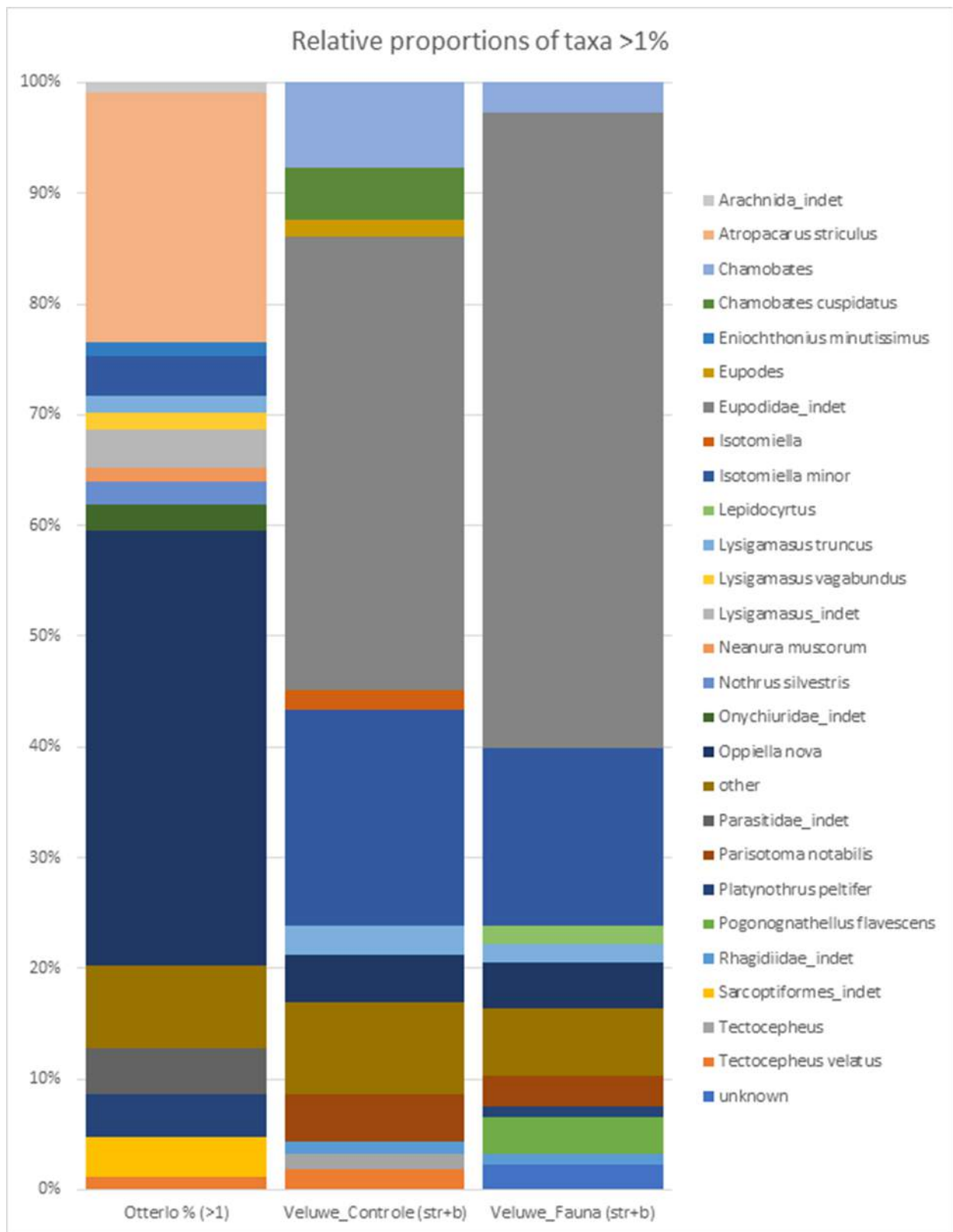
Figure B 4.6. PCA plots of the samples of the Veluwe mineral soil layer. Effect of rock powder based on presence and absence (unweighted, $P=0.19$ n.s.) and based on relative abundances of microarthropod taxa (weighted, $P=0.175$ n.s.).

Bijlage 5. Vergelijking microarthropoden van Otterlose bos strooisel met de Hoge Veluwe



Figuur B 5.1. Overeenkomsten en verschillen in de aanwezigheid van taxa in strooisel van het Otterlose bos (2019) en de proefveldjes op de Hoge Veluwe (2021 strooisel+bodem) in de controle zonder en met toegevoegd strooisel (+Fauna). *Ceratoppia quadridentata*, *Neanura muscorum* en *Steganacarus magnus* zijn mogelijk overgebracht met het strooisel

Figure B 5.1. Similarities and differences in presence of taxa in donor litter from Otterlose bos (2019) and the Hoge Veluwe experimental plots (litter+mineral soil layer, 2021) in the control without and with added litter (+Fauna). *Ceratoppia quadridentata*, *Neanura muscorum* en *Steganacarus magnus* may have been transported with the litter.



Figuur B 5.2. Relatieve abundanties van taxa in strooisel van het Otterlose bos (2019) en de proefveldjes op de Hoge Veluwe (2021 strooisel+bodem) in de controle zonder en met toegevoegd strooisel (+Fauna).

Figure B 5.2. Relative abundances of taxa in donor litter from Otterlose bos (2019) and the Hoge Veluwe experimental plots (litter+mineral soil layer, 2021) in the control without and with added litter (+Fauna).

ontwikkeling+beheer natuurkwaliteit

o+bn

Het Kennisnetwerk Ontwikkeling Beheer Natuurkwaliteit:

- is een onafhankelijk en innovatief platform waarin beheer, beleid en wetenschap op het gebied van natuurherstel en -beheer samenwerken;
- ontwikkelt en verspreidt kennis met als doel het structureel herstel en beheer van natuurkwaliteit.

**Kennisnetwerk OBN wordt gecoördineerd door de VBNE en gefinancierd door
het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en BIJ12**

Vereniging van bos- en natuurterreineigenaren (VBNE)

Princenhof Park 7
3972 NG Driebergen
0343-745250
info@vbne.nl

Alle publicaties en
producten van het
OBN Kennisnetwerk
zijn te vinden op
www.natuurkennis.nl