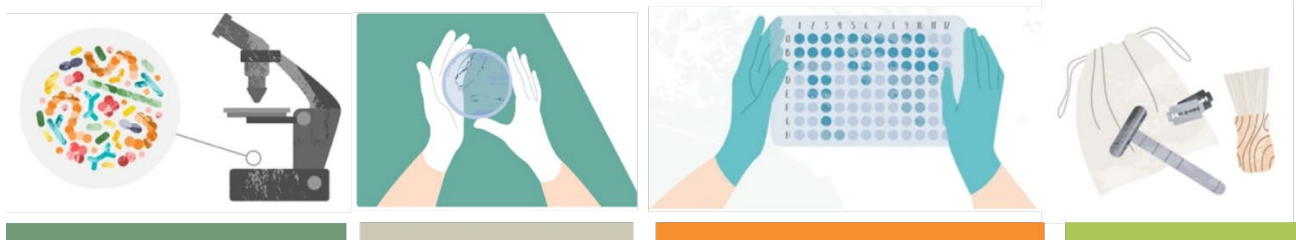




Het burgerwetenschappen
project: Bodemleven
Hoe gezond is jouw bodem?

Practicum: Bodemorganismen karakterisatie en bodem fysicochemische analyses

Handleiding



INHOUDSTAFEL

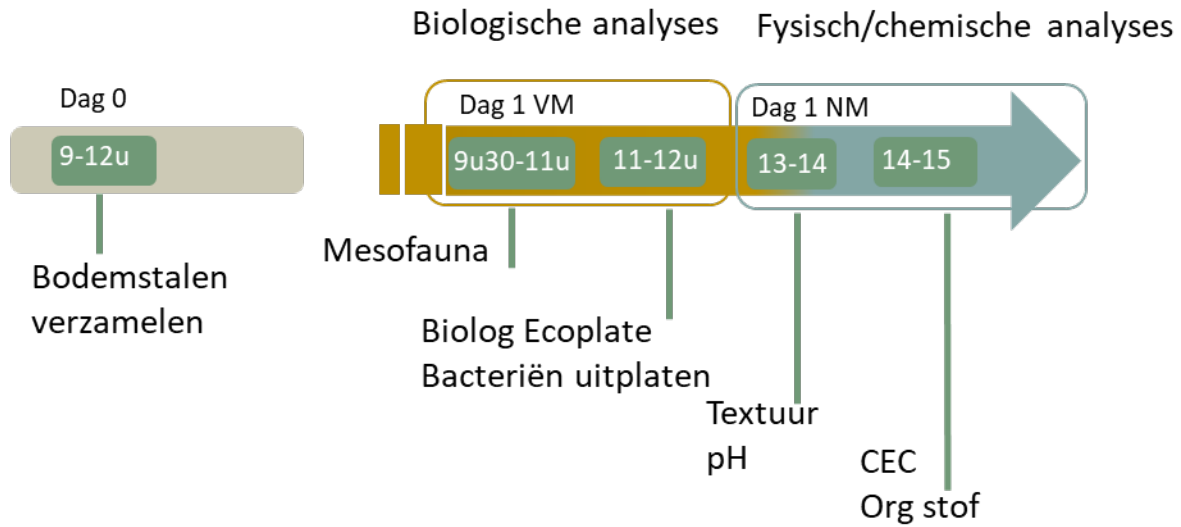
Deel 1: Bodemorganismen /bodemleven

Pagina	Inhoud
4	Overzicht
5	Inleiding
	Bodemleven en bodemvoedselweb
	Bodemleven project
9	Doelstellingen
10	Onderzoeksvragen
11	Pre-staalname vragen
15	Mesofauna isoleren
18	Mesofauna bench protocol
20	Post-labo vragen
23	Bodem microorganismen
27	Bacteriën uitplaten bench protocol
29	Biolog Ecoplate
30	BIOLOG bench protocol
32	Post-labo vragen

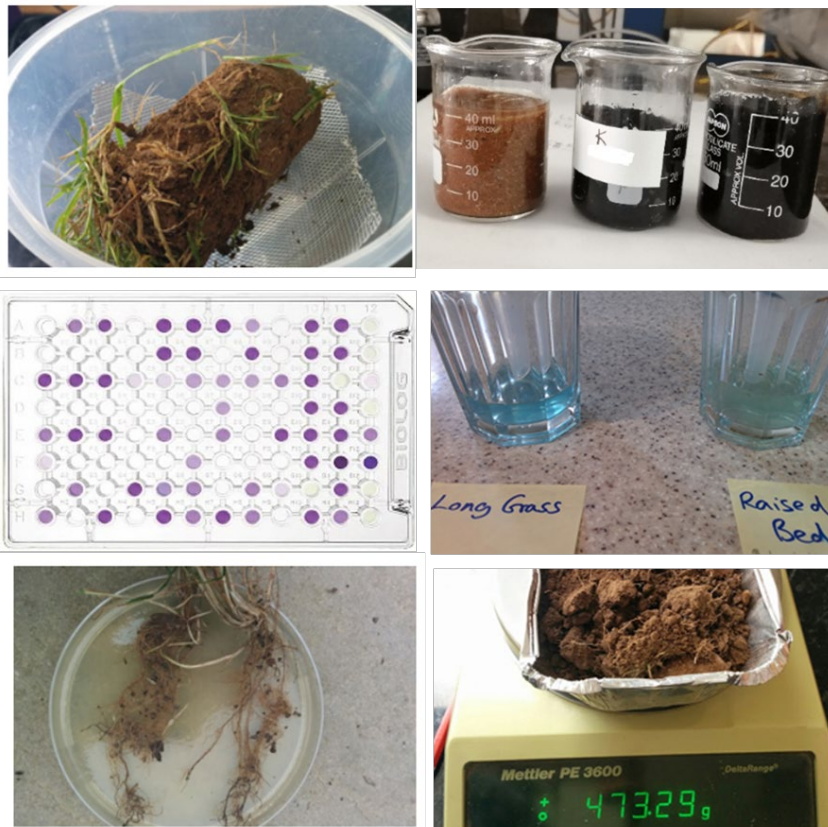
Deel 2: Bodem fysische en biochemische analyses

Pagina	Inhoud
36	Bodem zuurtegraad
37	pH bench protocol
37	Bodem textuur
38	Bodem textuur bench protocol
40	Kationuitwisselingscapaciteit
41	CEC bench protocol
42	Post-labo vragen
43	Bodem organische stof
45	Organische C bench protocol
48	Bodemstaal rapport
49	Databank aanvullen

OVERZICHT



Figuur 1: Overzicht practicum modules.



INLEIDING

Bodemleven en bodemvoedselweb

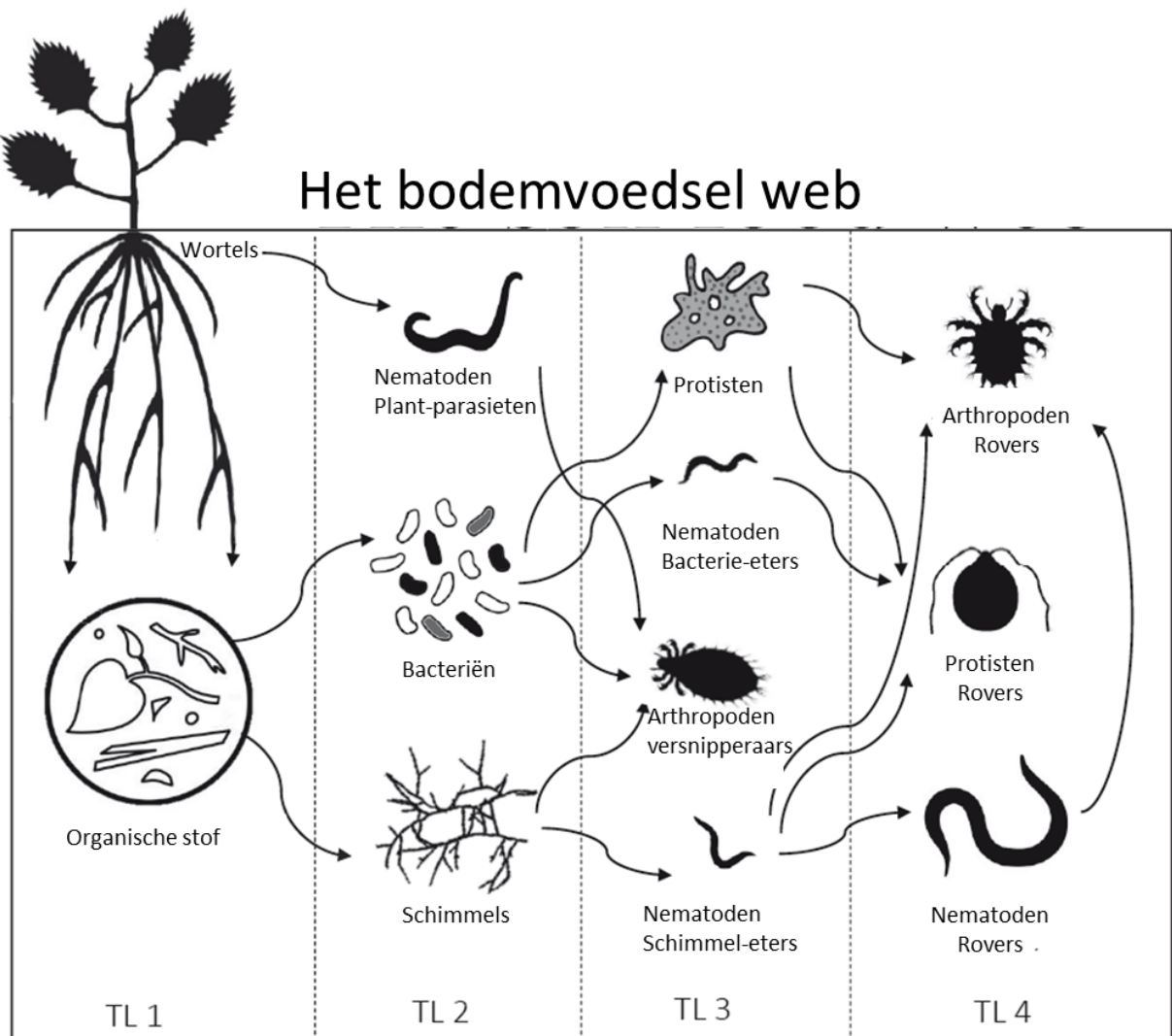
Wanneer je buiten wandelt en je voeten de grond raken, realiseer je je misschien niet dat je staat op het meest dichtstbevolkte habitat op aarde. De bodem herbergt een enorme hoeveelheid en diversiteit aan organismen (Anthony et al., 2023). Er leven meer organismen in één gram bodem dan er mensen zijn op deze planeet. Deze drukbevolkte gram wordt bewoond door tot wel 10 miljard bacteriën, meters schimmelhyfen, en een grote verscheidenheid aan nematoden, regenwormen, protisten en geleedpotigen (**Tabel 1**) (Bardgett en van der Putten 2014; Raynaud en Nunan 2014). Lange tijd beschouwden onderzoekers de bodem als een black box, omdat we niet in staat waren om het exacte leven dat erin aanwezig was te karakteriseren. De voornaamste reden voor deze onwetendheid is dat slechts 1-5% van de bodembacteriële populatie cultiveerbaar is, en dit percentage wordt zelfs lager geschat voor schimmels (Bakken 1997; Janssen et al. 2002; van Elsas et al. 2000).

Tabel 1: Het bodemleven onder één voetstap op een gezonde landbouwgrond.

Groep	Aantal	Biomassa (gram per vierkante meter)
Microfauna/flora		
Bacteriën	10 – 1000 biljoen	100 - 700
Schimmels	10 miljard – 10 biljoen	100 - 500
Protozoën	100 miljoen – 10 miljard	6 - 30
Nematoden	100 duizend – 10 miljoen	5 - 50
Mesofauna		
Mijten	2.100 – 41.000	0.2 – 4
Springstaartjes	2.100 - 41.000	0.2 - 4
Macrofauna		
Insectenlarven	Tot 50	< 4.5
Regenwormen	Tot 50	30 - 200

Uit: Louis Bolk Instituut. (n.d.). Bodembreed Interreg, Deel 1: Duurzaam Bodembeheer & Functionele Agrobiodiversiteit in de Bodem. Geraadpleegd van <https://www.louisbolk.nl/publicaties/bodembreed-interreg-deel-1-duurzaam-bodembeheer-functionele-agrobiodiversiteit-de-bodem>

Alle organismen in de bodem zijn op verschillende manieren aan elkaar gerelateerd. Die onderlinge samenhang heet een voedselweb. Net als boven de grond is het onder de grond een kwestie van eten en gegeten worden. Grofweg heeft het bodemvoedselweb een trapsgewijze opbouw (**Figuur 2**). Bacteriën en schimmels vormen vaak een eerste stap bij de afbraak van organisch materiaal. Protisten, schimmel- en bacterie-etende nematoden, potwormen en schimmeletende mijten en springstaarten zetten de volgende stap. Vervolgens worden deze organismen gegeten door carnivore nematoden, mijten en springstaarten. Duizendpoten, mollen en muizen zijn de laatste ondergrondse trap. Regenwormen, pissebedden, potwormen en plantenetende nematoden eten (ook) rechtstreeks organisch materiaal.



Figuur 2: het bodemvoedselweb. Bron: Bodembreed Interreg.

Bodemorganismen spelen een cruciale rol in talrijke functies waar we afhankelijk van zijn voor voedsel, vezels, menselijke gezondheid en de gezondheid van de omgeving. Een goed functionerend bodemvoedselweb vervult namelijk verschillende functies bijvoorbeeld voedingsstoffencycli, bevordering van plantproductiviteit, ziekteweerbaarheid, koolstofopslag, waterhoudend vermogen (Neher 1999). Ondanks het belang van bodemleven hebben we nog maar weinig tot geen inzicht in de biodiversiteit in Limburgse bodems en bij uitbreiding heel Vlaanderen en België. De identificatie van bodemleven wordt daarom beschouwd als een belangrijke uitdaging voor vele wetenschappers. Onze en jullie inzet hieraan, kan belanghebbenden in staat stellen om kwantitatief te pleiten voor het behoudt van de gezondheid van bodems, te midden van de biodiversiteitscrisis.

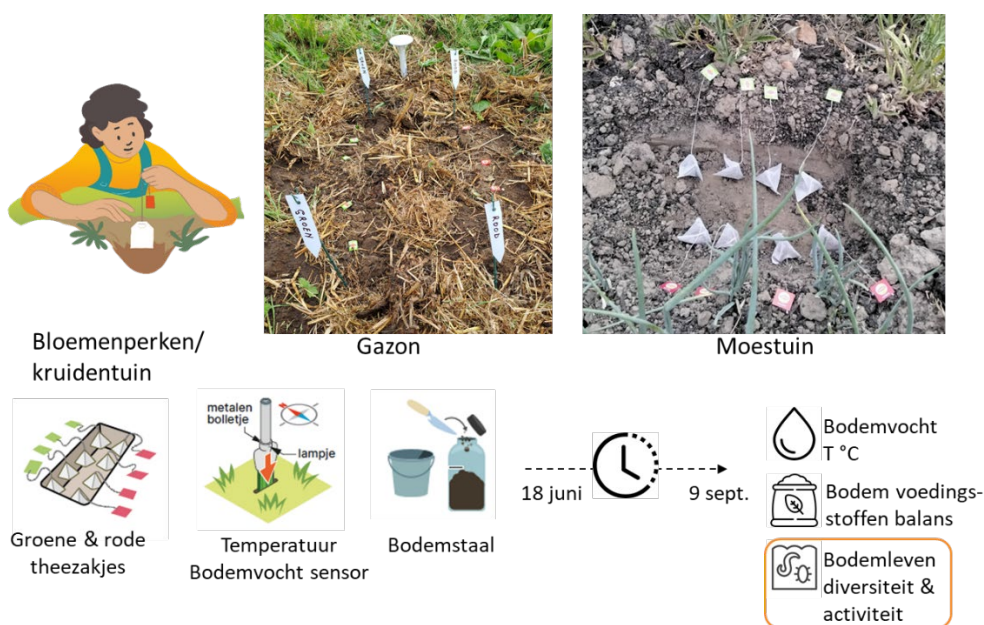
Het Bodemleven project

Hoe gezond is jouw bodem? Dat is de centrale vraag van het burgerwetenschappen project Bodemleven (2023-2024) die samen met 1000 burgers wordt onderzocht. De bodem onder onze voeten is letterlijk nog te veel een 'black box', wie leeft er, wat doen ze, waarom komen ze er voor. Wij zijn als mens heel erg afhankelijk van de bodem voor onze voedselvoorziening, vezels en materialen, kortom onze algehele gezondheid en welzijn. Klimaatverandering met langere periodes van droogte, hittegolven, bodemverontreiniging, verzouting, en grotere druk door ziekteverwekkers zijn 'stress' factoren die plantengroei en kwaliteit negatief beïnvloeden. Als we duurzame tuinen, landbouw, akkers, gazons willen in de toekomst moeten we goed begrijpen welke invloeden deze externe factoren hebben op de plant, maar ook op de bodem, en het bodemleven.

In dit project willen we voor het eerst inzichten verwerven in het bodemleven op grote schaal. Dit wordt uitgevoerd met een heel eenvoudig hulpmiddel, theezakjes. Op 18 juni werden 1000 bodemkits uitgedeeld en 8000 theezakjes, 4000 rode en 4000 groene theezakjes in een plekje in de tuin onder de grond begraven. Daarnaast werd er een tuindolk/sensor in de grond geplaatst die de bodemtemperatuur, vocht, en luchttemperatuur elke 15 min meet. Gedurende 3 maanden (juli-aug-september) konden bodem-microben zich te goed doen aan de thee, en slinkt de inhoud. Op het einde van de meetcampagne (9/9/2023), werden de theezakjes terug opgegraven en naar het labo gestuurd voor het eind gewicht te bepalen. Hoe minder er van de thee overblijft, hoe actiever je bodemleven. Van elke plek waar de thee was opgegraven

werd ook een bodemstaal genomen voor voedingsstoffen analyse. De data van de dolken werd uitgelezen.

Waar wij specifiek in geïnteresseerd zijn is welke bacteriën en schimmels uit de bodem de thee hebben aangetast, welke organismen zijn actief in het omzetten van organische stof naar bruikbare voedingsstoffen voor de plant. Hoe is het gesteld met de biodiversiteit van de bodem op jouw school? Op welk plekje verwacht je het rijkste bodemleven terug. Op welke plekken het minst, en kan je factoren aangeven die daar de oorzaak van kunnen zijn?



Figuur 3: Schets van de staalname plekken en gebruikte meetinstrumenten voor bodemleven.

DOELSTELLINGEN

Bodemleven brengt wetenschappelijk onderzoek op een toegankelijke manier naar de klas, via gerichte onderzoeksvragen, ontdekkingen, fysicochemische analyses en microscopische waarnemingen. Samen met je leerkracht en klasgenoten draag je door hands-on onderzoek bij aan het verzamelen van wetenschappelijke data binnen het bodemleven project.

In deze reeks practica ontdek je het bodemleven op jouw school door een grondige analyse uit te voeren op bodemmonsters. We gaan de mesofauna bestuderen onder de binoculaire microscoop, daarnaast zullen de bodemmonsters worden uitgeplaat op voedingsmedia om de aanwezigheid en diversiteit van micro-organismen te onderzoeken. De activiteit van de microfauna wordt geëvalueerd aan de hand van hun koolstofmetabolisme met Biolog Ecoplates. Als aanvulling hierop worden verschillende fysische en chemische eigenschappen van de bodem geanalyseerd, waaronder de pH-waarde, bodemtextuur, kationenuitwisselingscapaciteit (CEC), en het gehalte aan organische stof. Deze brede aanpak stelt ons als onderzoekers in staat om een diepgaand inzicht te verkrijgen in de biologische en fysicochemische kenmerken van de bodem en de interacties tussen de verschillende componenten van het bodemecosysteem. De resultaten van dit practicum zullen niet alleen bijdragen aan een beter begrip van bodemecologie, maar ook aan de ontwikkeling van strategieën voor duurzaam bodembeheer en behoud van biodiversiteit. De vier hoofddoelen zijn:

1. Betrek studenten actief bij biologisch onderzoek, zowel fundamenteel als toegepast
2. Moedig studenten aan om samen nieuwe wetenschappelijke ontdekking te doen en gegevens te verzamelen over het bodemleven van hun school.
3. Verhoog de interesse in wetenschap met een boeiend practicum over biodiversiteit en moleculaire biologie.
4. Laat studenten ervaren hoe het is om een bioloog/bodemkundige te zijn.

ONDERZOEKSVRAGEN

1. Hoe rijk is het bodemleven in jouw schoolbodem?
2. Op welk plekje verwacht je de meeste biodiversiteit, en waar minder?
3. Is er een verschil tussen bodemstalen genomen in het grasveld vs een bloemenperk/
moestuin op school?
4. Wat verschil verwacht je in bodemmesofauna tussen bodemstalen met veel
mulch/bladmateriaal (hoog organische koolstof, vb natuurlijk beheerd weiland,
soortenrijke berm), vs arme bodems: vertrapeld wandelpad, ..).
5. Misschien heb je wel een experiment gedaan op school waarbij in 1 bak aardbeien
worden geteeld met compost, en in een andere bak, aardbeien zonder compost. Wat
effect zou de compost toevoeging hebben op het bodemleven?
6. Komen de soorten altijd voor, of zijn sommige er enkel in de winter, lente, herfst of
zomer
7. Wat kan het effect zijn van langdurige droogte op het bodemleven?
8. Wat zijn de gevolgen van een verstoord bodemleven op de bodemkwaliteit,
vruchtbaarheid, en groei van de planten?

PRE-STAAALNAME VRAGEN

Lees door de hele handleiding en beantwoord de volgende vragen:

1. Bekijk deze video over de rol van het plant-microbioom: "<https://www.youtube.com/watch?v=-dhdUoK7s2s>". Nadat je het helemaal hebt uitgekeken, haal 1 of 2 quotes uit de video die voor jou eruit sprongen. Schrijf dan een verklaring of extra uitleg waarom je de quote hebt gekozen. Discussieer in groep.

- QUOTE 1:
- Uitleg:

- QUOTE 2:
- Uitleg

2. Welke specifieke onderzoeksvragen over bodemleven in jouw school wil jij graag beantwoorden?

➤ Onderzoeksvraag 1:

➤ Onderzoeksvraag 2:

➤ Onderzoeksvraag 3:

3. Welke bodemstalen ga je nemen om je onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden. Denk hierbij ook aan herhalingen. Neem je ook controle-stalen mee? Gebruik de ruimte hieronder om je staalname te schetsen.

4. Wat zijn je verwachtingen? Voorspel op basis van wat je kan lezen in deze practicumhandleiding, de leerstof, en andere achtergrondinformatie die je kan opzoeken over bodemleven, welke groepen van organismen verwacht je terug te vinden. Eventueel ook al welke soorten? Komen dezelfde bacteriesoorten voor in de bodem als bv in onze darmen?

➤ Hypothese 1:

➤ Hypothese 2:

➤ Hypothese 3:

5. Waar ga je op letten bij het nemen van de bodemstalen? Mag je bijvoorbeeld voor elk staal dezelfde schep gebruiken, of ga je de schep kuisen tussenin? Hoe vermijd je cross-contaminatie? Hoe diep ga je staal nemen? Hoe ga je de stalen labelen? Schrijf hieronder enkele aandachtspunten op waar je op gaat letten bij het staalnemen.

1. Staal informatie. Vul de tabel hieronder zo nauwkeurig mogelijk aan: de staalcode (label), en alle informatie die je hebt over het staal: wie heeft het staal genomen, tijdstip, diepte, zag je iets specifiek aan de kleur, textuur, geur van de bodem, wat waren de weersomstandigheden (T°C, neerslag). Is het plekje begroeid met planten, zag je regenwormen of andere bodemorganismen?

Staalcode	Staalnemer	Tijdstip	Locatie	Diepte	Andere opmerkingen

Bodem micro-en mesofauna onderzoek

Gronden, inclusief de strooisellaag, bieden een habitat voor een breed scala aan bodemorganismen. Organismen die zichtbaar zijn voor het blote oog, maar die door een opening van 2 mm passen, worden "mesofauna" genoemd, terwijl kleinere dieren micro-organismen zijn die een microscoop nodig hebben om te bekijken, en grotere worden macrofauna genoemd.

Microfauna

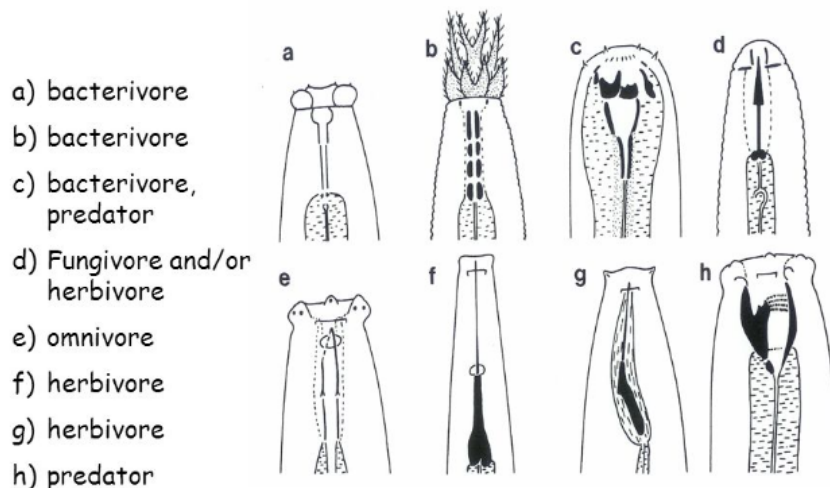
De microfauna (< 0,1 mm in diameter) omvat onder andere kleine springstaarten en mijten, nematoden en protozoa die over het algemeen leven in de waterfilms in de bodem en zich voeden met microflora, plantenwortels, andere microfauna en soms grotere organismen (bijv. entomopathogene nematoden voeden zich met insecten en andere grotere ongewervelden). Ze zijn belangrijk om voedingsstoffen vrij te maken die geïmmobiliseerd zijn door bodemmicro-organismen.

Nematoden

Nematoden zijn kleine draadvormige rondwormen die overal in de bodem voorkomen. Ze kunnen vrij levend zijn in waterfilms in de bodem; gunstig zijn voor de landbouw of fytoparasitair zijn, en leven aan het oppervlak of binnenin levende wortels (parasieten). Vrij levende nematoden grazen op bacteriën en schimmels, waardoor ze de populaties van schadelijke micro-organismen onder controle houden. Deze nematoden zijn 0,15–5 mm lang en 2–100 µm breed; een uitzondering zijn de Mermithidae nematoden, die tot 20 cm lang kunnen zijn en veel voorkomen in tropische bodems, als parasieten van sommige geleedpotigen zoals sprinkhanen. Nematoden kunnen zich alleen door de bodem bewegen waar een film van vocht de bodemdeeltjes omringt. Ze leven in het water (ze zijn hydrobionten) dat de ruimtes tussen bodemdeeltjes vult en wortels bedekt. In hete en droge omstandigheden gaan ze over in een rustfase, en zodra water beschikbaar wordt, komen ze weer tot activiteit.

Nematoden worden erkend als een belangrijke consumentengroep in bodems, over het algemeen ingedeeld in vier tot vijf trofische categorieën op basis van de aard van hun voedsel, de structuur van de stoma (mond) en slokdarm, en de voedingsmethode (Yeates en Coleman, 1982): bacterie-etters, schimmel-etters, roofdieren, alleseters en planteneters. De bacterie-etters jagen op bacteriën (bacterivoren) en kunnen tot 5.000 cellen per minuut innemen, of

6,5 keer hun eigen gewicht per dag. Dit helpt bij het verspreiden van zowel het organische materiaal als de afbrekers in de bodem. Bacterie- en schimmel-eter-nematoden geven een groot percentage N vrij wanneer ze zich voeden met hun prooigroepen en zijn dus verantwoordelijk voor een groot deel van de voor planten beschikbare N in de meeste bodems (Ingham et al., 1985). De jaarlijkse totale consumptie kan wel 800 kg bacteriën per hectare bedragen en de hoeveelheid N die wordt omgezet kan variëren tussen 20–130 kg (Coleman et al., 1984).



Mondstructuren nematoden

Fytofagen of planteneterende nematoden beschadigen plantenwortels, met belangrijke economische gevolgen voor boeren. Ze hebben stiletten met een grote diversiteit aan grootte en structuur, en ze zijn de meest uitgebreid bestudeerde groep van bodemnematoden vanwege hun vermogen om plantenziekten te veroorzaken en de gewasopbrengst te verminderen.

Mesofauna

Bodemmesofauna (0.1-2 mm in diameter) zijn de meest voorkomende zichtbare organismen in de meeste terrestrische ecosystemen en worden gedomineerd door mijten, springstaarten, insecten, andere hexapoden en kleinere oligochaete wormen. Het aantal en de diversiteit van bodemmesofauna geven de bodemprocessen aan. Mesofauna-biomassa weerspiegelt de hoeveelheid organisch materiaal die wordt aangemaakt in de bodem en geeft een algemene indicator van de snelheid van bodemfuncties; de soorten organismen geven aan hoe snel voedingsstoffen worden omgezet (hoe snel voedingsstoffen worden vrijgegeven uit organisch materiaal) en de niveaus van verstoring. Een gedetailleerder begrip van gemeenschappen

van bodemmesofauna kan veel andere bodemeigenschappen weerspiegelen, zoals pH en vochtregime.

Springstaarten

Collembola of "springstaarten" zijn micro-arthropoden die leven in de strooisellaag of in de poriën van de bovenste 10-15 cm van de bodem. Ze zijn saprofagisch en voeden zich voornamelijk met schimmels, bacteriën en algen die groeien op afbreekbaar plantaardig materiaal (Ponge, 1991). Ze zijn belangrijk als epigeëische afbrekers. In tegenstelling tot de meeste insecten hebben ze op geen enkel moment vleugels. Ze meten enkele millimeters in lengte (Figuur A1.4) en hebben een karakteristiek salutatoir orgaan, een gevorkte "staart", waarmee ze kunnen springen wanneer ze in gevaar zijn. Springstaarten zijn waarschijnlijk de meest voorkomende groep insecten op aarde.

Pseudoschorpioenen

Pseudoschorpioenen zijn kleine geleedpotigen zelden langer dan 8 mm. Ze leven in strooisel, rottend plantaardig materiaal en de bodem. Pseudoschorpioenen lijken oppervlakkig op echte schorpioenen, met relatief grote scharen aan de pedipalpen, maar ze hebben geen telson of angel. Pseudoschorpioenen voeden zich met zeer kleine geleedpotigen zoals springstaarten en mijten.

In dit deel van het practicum zullen we van de genomen bodemmonsters bodemmesofauna extraheren en de resultaten interpreteren. Studenten zullen een bekende hoeveelheid bodem verzamelen en bodemmesofauna extraheren met behulp van een trechteropstelling, dat gebruikmaakt van het natuurlijke gedrag van de meeste bodemorganismen om overmatige hitte, licht en droogte te vermijden, om exemplaren in een verzamelingspot te drijven.

Leerdoelen:

- Begrijpen dat bodems de basis zijn van een brede biodiversiteit.
- Begrijpen hoe te monstere voor, en bodemmesofauna te extraheren.
- Begrijpen bodemeigenschappen en verstoring bodemgemeenschappen beïnvloeden.
- Bodemmesofauna identificeren en classificeren met behulp van een eenvoudige determinatiesleutel.

MESOFAUNA BENCH PROTOCOL

Klas materialen

- Vers verzameld bladafval en de bovengrond - verzameld onder een loofboom of andere geschikte habitat.
 - Schep voor het verzamelen van bladafval/grond
 - Tuinhandschoenen
 - Plasticfolie
-
- Witte determineerbak één per leerling/paar
 - Standaard keukenzeef (één per leerling/paar)
 - Kleine petrischaaltjes met een diameter van 5 cm met heldere deksels.
 - Microscopen (USB of binoculaire dissectiemicroscoop met bovenverlichting)
 - Lampen (indien nodig) om microscopische preparaten te verlichten.
 - Gedrukte/gelamineerde visuele identificatiegids (zie bijlage).
 - Uitbreiding - keukenpapier
 - ...

Mesofauna extractie procedure: overnacht

1. Giet ongeveer 15 ml van een 70% ethanol oplossing in een 50 ml maatbeker
2. Plaats deze maatbeker voorzichtig onderaan een groot glas
3. Plaats de trechter in het glas zodat de punt van de trechter zich boven de 50 ml beker bevindt, maar niet met de trechterpunt in de ethanoloplossing.
4. Bekleed de trechter met een metalen gaas met gaten van 2 mm, zorg dat de randen goed aansluiten zodat er geen openingen zijn.
5. Neem wat bodem en voeg deze toe in je trechter
6. Plaats een bureaulamp op een hoger oppervlak en richt deze naar beneden, zodat de lamp 2-3 cm van de bodem verwijderd is, en zet de lamp aan.
7. Laat het geheel 5 dagen (maximaal) een nacht (minimaal) staan. Let op: voor een volledige extractie van alle organismen moet de bodem aan het einde van het proces volledig droog zijn.
8. Verwijder voorzichtig de trechter en droge bodem en leg deze even opzij.
9. Verwijder de 50 ml verzamel maatbeker en roer voorzichtig de inhoud en giet het in een petrischaal.

Mesofauna extraheren met zeven

1. Een emmer met verschillende bodems, inclusief de strooisellaag, staan klaar. Schep voorzichtig een handvol op en plaats het in de zeef.
2. Stuiter het bodem/strooiselmengsel voorzichtig op en neer over een witte bak gedurende enkele seconden.
3. Onderzoek de witte bak en probeer bodemmesofauna te spotten - sommige zijn behoorlijk groot, maar anderen kunnen verschijnen als kleine, bewegende puntjes tussen de bodemdeeltjes.
4. Met een pasteurpipet of lepeltje probeer je bodemmesofauna's te isoleren in een petrischaal, en plaats onmiddellijk terug het deksel erop.
5. Herhaal de stappen 4-6 gedurende 5-10 minuten totdat je een breed scala aan bodemmesofauna hebt verzameld.
6. Gooi de gebruikte bodem van je zeef en bakken in de afvalcontainer

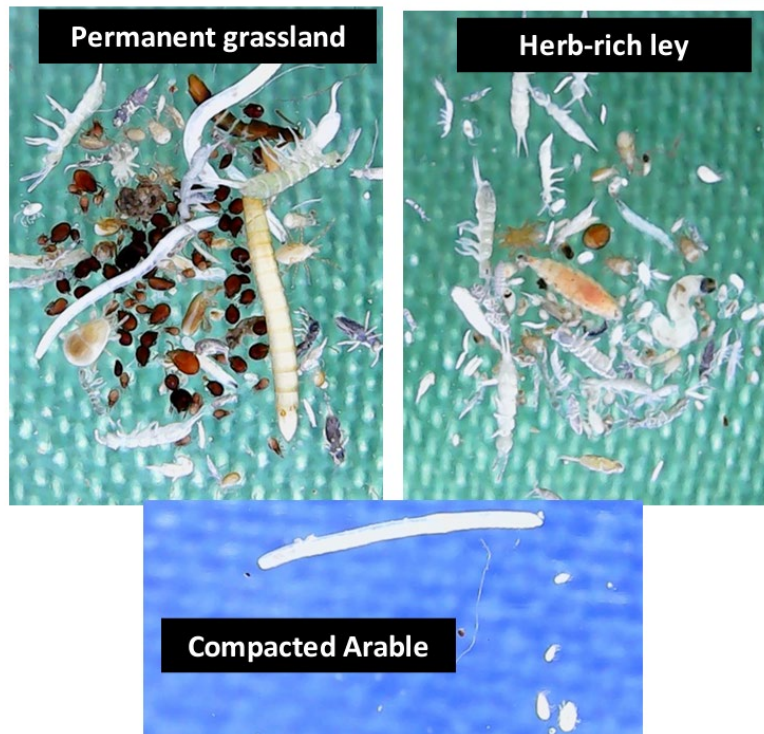
Mesofauna bestuderen

7. Plaats de petrischaal onder een microscoop (binoculair of USB) en vergelijk de aantallen, maten en soorten organismen -?
8. Bekijk de bodemdieren die je hebt verzameld.
 - a. Bekijk hun lichaamskenmerken, kaken, de manier waarop ze bewegen, hun gedrag. Denk je dat deze dieren roofdieren of afbrekers zijn?
 - b. Zijn ze groot en bleek/gekleurd, of kleiner en donker/hard?
 - c. Hoeveel organismen zijn er tevoorschijn gekomen en hoe verhoudt dit zich tot het type bodemstaal
 - d. Denk je dat deze dieren nuttig kunnen zijn voor gewassen of ongedierte? Waarom en hoe zou dit kunnen?
9. Bekijk de afbeeldingsgids/zoekkaarten en tabellen.
 - a. Zijn er dieren die lijken op die op de foto's?

POST-LABO VRAGEN

Interpretatie van de gegevens.

Indien er maar enkele organismen zijn gevonden, geeft dat aan dat er weinig organisch materiaal beschikbaar is om de bodemfauna te ondersteunen of om bodemfuncties en -processen te voeden. Bespreek: wat zijn de bodemprocessen die energie nodig hebben?



Veel kleine, ronde, zeer donkere organismen (zie Permanente Grasland hierboven): dit zijn oribatidenmijten, die afbrekers zijn en overvloediger voorkomen waar het organische materiaal minder voedingsstoffen bevat. Ze leven langer (3-4 jaar), groeien langzaam en moeten zichzelf beschermen (hun donkere kleur is te wijten aan hun harde, gesclerotiseerde, gepantserde exoskelet).

Meestal grotere, bleke organismen (zie Kruidenrijke berm): deze duiden op snelle omzetting van voedingsstoffen: snelle groei van planten, die een hoog gehalte aan voedingsstoffen hebben en snel ontbinden om voedingsstoffen snel vrij te geven. De bodemorganismen groeien sneller en worden groter, wat wijst op een overvloedige aanvoer van voedsel.

Weinig kleine witte organismen (zie Verdichte akker hierboven): dit kunnen verwanten van huisstofmijten zijn (harig!) en duiden op verstoorde habitats met weinig beschikbaar voedsel

of droge omstandigheden. Deze dieren verspreiden zich gemakkelijk (hun nimfen reizen op insecten) en planten zich snel voort om tijdelijk beschikbare voedselvoorraden op te gebruiken.

2. Vul de lijst met gevonden resultaten aan. Neem ook foto's.

# individuen	Soort	Functies
1	Pseudoschorpioenen	<ul style="list-style-type: none"> - Kleine geleedpotigen zelden langer dan 8 mm. - leven in strooisel, rottend plantaardig materiaal en de bodem. - Voeden zich met zeer kleine geleedpotigen zoals springstaarten en mijten.
Nematoden		
Collembola of 'springstaarten'		
Mijten		

Enchytraeïden of rondwormen		
--------------------------------	--	--

Roofdieren zijn vaak snel bewegend en voortdurend actief, en/of zijn uitgerust met grote monddelen of bijvoorbeeld scharen voor aanval. Afbrekers zijn meestal langzamer in beweging, maar kunnen snel bewegen om te ontsnappen, en hebben kleinere monddelen. Afbrekers hebben vaak verdedigingsmechanismen - veel springstaarten zijn uitgerust met een springorgaan (genaamd een furca) dat hen veiligheid biedt door hen weg te werpen. Anderen, zoals langzaam bewegende mijten, kunnen goed gepantserd zijn (donker en glanzend) of zeer lange haren hebben, of zelfs stapels vuil of oude vervellingen als hun verdediging. Sommige (meestal witte) bodembewonende springstaarten hebben geen zichtbare verdediging, maar hebben giftklieren om aanvallers af te weren.

Afbrekers geven voedingsstoffen vrij in de bodem in vormen die toegankelijker zijn voor planten en daardoor de groei van gewassen enzovoort ondersteunen. Ze helpen ook bij het verwijderen van organisch afval en hun uitwerpselen worden humus die bodemwater en -voedingsstoffen opslaat. Roofdieren recycleren ook voedingsstoffen, maar hebben ook het bijkomende voordeel van het controleren van plagen. Waar de bodem overvloedige roofdieren ondersteunt, worden aantallen plagen zoals wortel-voedende nematoden gecontroleerd.

Achtergrond bodem micro-organismen

Micro-organismen zijn de kleinste organismen ($< 0,1$ mm in diameter) en ze zijn buitengewoon overvloedig en divers in de bodem. Ze omvatten algen, bacteriën, cyanobacteriën, schimmels, gisten, slijmzwammen en actinomyceten die in staat zijn om bijna elk bestaand natuurlijk materiaal af te breken. Micro-organismen transformeren organisch materiaal in plantenvoedingsstoffen die door planten worden opgenomen. Twee hoofdgroepen worden normaal gesproken aangetroffen in gezonde bodems: bacteriën en mycorrhizaschimmels.

Bacteriën

Bacteriën zijn belangrijk in bodems omdat ze bijdragen aan de koolstofcyclus door fixatie (fotosynthese) en ontbinding. Sommige bacteriën zijn belangrijke afbrekers en andere, zoals actinomyceten, zijn bijzonder effectief in het afbreken van taai stoffen zoals cellulose (dat de celwanden van planten vormt) en chitine (dat de celwanden van schimmels vormt). Landbeheer heeft invloed op de structuur van bacteriële gemeenschappen omdat het van invloed is op voedingsstoffenniveaus en dus de dominantie van afbrekers van bacteriën naar schimmels kan verschuiven.



Symbiose tussen rhizobia en vlinderbloemigen

Een groep bacteriën is bijzonder belangrijk in de stikstofcyclus. Vrijlevende bacteriën fixeren atmosferische stikstof, waardoor het wordt toegevoegd aan de stikstofpool in de bodem; dit wordt biologische stikstofbinding genoemd en is een natuurlijk proces dat zeer gunstig is in de landbouw. Andere stikstofbindende bacteriën (rhizobia) vormen associaties (in de vorm van knobbeltjes) met de wortels van vlinderbloemige planten.

Actinomyceten zijn een brede groep bacteriën die draadvormige filamenten vormen in de bodem. De kenmerkende geur van vers blootgestelde, vochtige grond wordt toegeschreven aan deze organismen, vooral aan de voedingsstoffen die ze vrijgeven als gevolg van hun metabolische processen. Actinomyceten vormen associaties met sommige niet-vlinderbloemige planten en fixeren stikstof, dat vervolgens beschikbaar is voor zowel de gastheer als andere planten in de nabije omgeving.



Actinomyceten op petriplaat

Bacteriën produceren een plakkerige stof in de vorm van polysacchariden (een type suiker) die helpt bij het binden van bodemdeeltjes tot kleine aggregaten, waardoor structurele stabiliteit aan de bodems wordt verleend. Zo zijn bacteriën belangrijk omdat ze helpen bij het verbeteren van de stabiliteit van bodemaggregaten, waterinfiltratie en waterretentiecapaciteit. Over het algemeen is hun effect echter minder opvallend dan dat van grote ongewervelden zoals regenwormen.

Schimmels

Schimmels zijn verantwoordelijk voor het belangrijke proces van afbraak in terrestrische ecosystemen omdat ze cellulose afbreken en assimileren, het bestanddeel van plantencelwanden. Schimmels bestaan uit microscopische cellen die meestal groeien als lange draden of strengen, hyfen genaamd, met een diameter van slechts een paar micrometers, maar met het vermogen om zich uit te strekken van enkele cellen tot vele meters. Bodemschimmels kunnen worden gegroepeerd in drie algemene functionele groepen op basis van hoe ze hun energie verkrijgen:

Afbrekers - saprofytische schimmels - zetten dood organisch materiaal om in schimmelbiomassa, CO₂ en kleine moleculen, zoals organische zuren. Deze schimmels gebruiken over het algemeen complexe substraten, zoals cellulose en lignine in hout. Ze zijn essentieel voor het afbreken van de koolstofringstructuren in sommige verontreinigende stoffen. Net als bacteriën zijn schimmels belangrijk voor het immobiliseren of vasthouden van voedingsstoffen in de bodem.

Mutualisten - mycorrhiza-schimmels - koloniseren plantenwortels via een symbiotische relatie. De definitie van symbiose is een nauwe, langdurige associatie tussen twee of meer verschillende organismen van verschillende soorten die elk lid ten goede kan komen. Mycorrhiza vergroten het oppervlak dat is verbonden met de plantenwortel, waardoor de plant bij voedingsstoffen en water kan komen die anders niet beschikbaar zouden zijn. Mycorrhiza breiden feitelijk het bereik van de plant uit naar water en voedingsstoffen, waardoor planten meer van de beschikbare middelen in de bodem kunnen gebruiken. Mycorrhiza halen hun koolhydraten (energie) uit de plantenwortel waarin/ waarop ze leven en helpen meestal de planten door fosfor (P) vanuit de bodem naar de wortel over te brengen. Er worden twee belangrijke groepen geïdentificeerd: (i) ectomycorrhiza, die op de oppervlaktelagen van de wortels groeien en vaak geassocieerd worden met bomen; en (ii) endomycorrhiza, zoals arbusculaire mycorrhiza-schimmels en vesiculaire mycorrhiza-schimmels, die binnenin de wortelcellen groeien en vaak geassocieerd worden met grassen, akkerbouwgewassen, groenten en struiken. Arbusculaire mycorrhiza-schimmels kunnen ook de fysieke kenmerken van de bodem ten goede komen omdat hun hyfen een netwerk vormen om bodemaggregaten te helpen stabiliseren. Vesiculair-arbusculaire mycorrhiza zijn de meest wijdverbreide mycorrhiza-schimmels. Mycorrhiza zijn vooral belangrijk voor de opname van fosfaat omdat P niet gemakkelijk naar de plantenwortels beweegt. Deze organismen schaden de plant niet

en in ruil daarvoor voorziet de plant de schimmel van energie in de vorm van suikers. De schimmel is eigenlijk een netwerk van filamenten dat groeit in en rond de plantencellen, waardoor een massa ontstaat die aanzienlijk verder reikt dan het wortelstelsel van de plant.

Ziekteverwekkers of parasieten veroorzaken verminderde productie of dood wanneer ze wortels en andere organismen koloniseren. Wortelpathogene schimmels, zoals *Verticillium*, *Pythium* en *Rhizoctonia*, veroorzaken elk jaar aanzienlijke economische verliezen in de landbouw. Veel schimmels helpen bij de bestrijding van ziekten, bijvoorbeeld nematodenvalschimmels die ziekteverwekkende nematoden parasiteren, en schimmels die zich voeden met insecten kunnen nuttig zijn als biologische bestrijdingsmiddelen.

In dit practicum gedeelte zullen we bodembacteriën cultiveren. Het bepalen van de diversiteit van bacteriën en schimmels in bodemmonsters is van cruciaal belang voor het begrijpen van bodemecosystemen en het evalueren van hun gezondheid en functionaliteit. Door bodemmonsters op voedingsmedia uit te platen, kunnen we een breed scala aan bacteriën en schimmels cultiveren en hun diversiteit analyseren. Deze benadering stelt ons in staat om inzicht te krijgen in de microbiële gemeenschappen die aanwezig zijn in verschillende bodemtypes en om de effecten van verschillende omgevingsfactoren op deze gemeenschappen te onderzoeken.

BACTERIËN UITPLATEN BENCH PROTOCOL

Klas materialen

- Bunsenbrander
- Petriplaten met voedingsbodem: TSA, R2A of gelijkaardig

Materialen per groep

- Periplaten met voedingsbodem
- Drigalski spatel
- Proefbuisje met 1 gram bodem in P-buffer en geschud voor paar minuten
- Steriele 15 ml proefbuisen met 10 ml P-buffer (voor verdunningen)
- Pipet 100-1000 μ l
- Bunsenbrander

Vorbereitung:

1. Suspendeer 1 g bodem van elke monster in 10 mL 10 mM PBS-buffer (130 mM NaCl, 7 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4).
2. Schud gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur (20°C) om ervoor te zorgen dat alle schimmelsporen goed gemengd zijn.
3. Laat na het schudden de bodemdeeltjes 30 minuten bezinken bij 4°C
4. Verdun elk monster 1/20 in 10 mM PBS-buffer om het aantal cellen te verminderen.

Procedure:

1. Label de petrischalen met de bodemmonsters en de bijbehorende voedingsmedia om verwarring te voorkomen.
2. Open voorzichtig de petrischalen met het voedingsmedium en plaats ze op een stabiel en schoon werkoppervlak.
3. Neem 100 μ l vloeistof uit het 1/20 verdunde staal, breng aan op de voedingsbodem en vervolgens spreidt uit met de drigalski spatel.
4. Verdeel de bodem gelijkmatig over het oppervlak van het voedingsmedium in de petrischaal.

5. Sluit de petrischalen zorgvuldig af met deksels om contaminatie te voorkomen en plaats ze in een incubator op 30°C.
6. Incubeer de petrischalen gedurende een aantal dagen tot er zichtbare kolonies worden gevormd.
7. Controleer regelmatig de petrischalen op groei van bacteriën en schimmels. Noteer de verschillende kolonies die verschijnen, inclusief hun grootte, vorm, kleur en textuur.
8. Identificeer de verschillende bacteriële en schimmelkolonies aan het einde van de incubatieperiode door middel van morfologische kenmerken, zoals kleur, vorm en textuur.



Foto 1: Petriplaat gevuld met kolonies bacteriën en schimmels

Biolog EcoPlate

De Biolog EcoPlate™ is een speciaal ontwikkelde test voor bodem microbiologische gemeenschapsanalyse en ecologische studies (Garland en A. Mills, 1991). Een gemengde populatie micro-organismen wordt geënt op suikers en het metabolisme in de loop van de tijd gemeten, en de ontwikkelde 'fingerprint' is kenmerkend voor de gemeenschap. Deze benadering, community-level physiological profiling genaamd, of CLPP, blijkt effectief bij het onderscheiden van veranderingen in microbiële gemeenschappen over de tijd, of tussen locaties.

In dit practicum, gaan we de EcoPlates gebruiken om de activiteit en functionele diversiteit van de gemeenschappen te beoordelen en vergelijken tussen bodemstalen. Omdat bacteriën zich dicht bij de basis van de voedselketen bevinden, zijn veranderingen in microbiële gemeenschappen vaak een voorbode van veranderingen in de gezondheid van het milieu als geheel.

De EcoPlate bevat 31 koolstofbronnen (en een controlewel zonder substraat) in drievoud. De selectie van koolstofbronnen is gebaseerd op een hoge consumptie door bodemmicro-organismen.

EcoPlate™

A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A5 Water	A6 β-Methyl-D-Glucoside	A7 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A8 L-Arginine	A9 Water	A10 β-Methyl-D-Glucoside	A11 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A12 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B5 Pyruvic Acid Methyl Ester	B6 D-Xylose	B7 D-Galacturonic Acid	B8 L-Asparagine	B9 Pyruvic Acid Methyl Ester	B10 D-Xylose	B11 D-Galacturonic Acid	B12 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C5 Tween 40	C6 l-Erythritol	C7 2-Hydroxy Benzoic Acid	C8 L-Phenylalanine	C9 Tween 40	C10 l-Erythritol	C11 2-Hydroxy Benzoic Acid	C12 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D5 Tween 80	D6 D-Mannitol	D7 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D9 Tween 80	D10 D-Mannitol	D11 4-Hydroxy Benzoic Acid	D12 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Amino Butyric Acid	E4 L-Threonine	E5 α-Cyclodextrin	E6 N-Acetyl-D-Glucosamine	E7 γ-Amino Butyric Acid	E8 L-Threonine	E9 α-Cyclodextrin	E10 N-Acetyl-D-Glucosamine	E11 γ-Amino Butyric Acid	E12 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 β-Hydroxy-Glycyl-L-Glutamic Acid	F5 Glycogen	F6 D-Glucosaminic Acid	F7 Itaconic Acid	F8 β-Hydroxy-Glycyl-L-Glutamic Acid	F9 Glycogen	F10 D-Glucosaminic Acid	F11 Itaconic Acid	F12 β-Hydroxy-Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Keto Butyric Acid	G4 Phenylethylamine	G5 D-Cellobiose	G6 Glucose-1-Phosphate	G7 α-Keto Butyric Acid	G8 Phenylethylamine	G9 D-Cellobiose	G10 Glucose-1-Phosphate	G11 α-Keto Butyric Acid	G12 Phenylethylamine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H5 α-D-Lactose	H6 D,L-α-Glycerol Phosphate	H7 D-Malic Acid	H8 Putrescine	H9 α-D-Lactose	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate	H11 D-Malic Acid	H12 Putrescine

FIGURE 1. Carbon Sources in EcoPlate

BIOLOG ECOPLATE BENCH PROTOCOL

Klas materialen

- Bunsenbrander
- 8-channel of single pipet van 10-1000 of van 10 μ l

Materialen per groep

- Biolog Ecoplaten
- Pipet 100-1000 μ l en steriele tips.
- Drigalski spatel
- Proefbuisje met 1 gram bodem in P-buffer en geschud voor paar minuten
- Steriele 15 ml proefbuizen met 10 ml P-buffer (voor verdunningen)
- Bunsenbrander

Staalname/staalvoorbereiding

1. Neem bodemmonsters (5-10 g) uit elk perceel/veld. Zorg voor voldoende biologische herhalingen om biologische variatie te compenseren.
2. Zeef bodemmonsters (2 mm zeef).

Procedure

5. Los 1 g bodemmonster van elke monster op in 10 mL 10 mM PBS-buffer (130 mM NaCl, 7 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4).
6. Schud gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur (20°C) om ervoor te zorgen dat alle schimmelsporen goed gemengd zijn.
7. Laat na het schudden de bodemdeeltjes 30 minuten bezinken bij 4°C, of flocculeer het supernatant chemisch met 1 g CaCO_3 en CaCl_2 om zwevende kleideeltjes te verwijderen.
8. Verdun elk monster 1/20 in 10 mM PBS-buffer om het aantal cellen te verminderen.
9. Verdeel 130 μ L van het supernatants in elk welletje van de BIOLOG Ecoplates.
10. Plaats geïnoculeerde platen in zelfsluitende plastic zakken met daarin een met water doordrenkte papieren doekje om verdamping uit de welletjes te minimaliseren, en incubeer bij 28-30 °C.

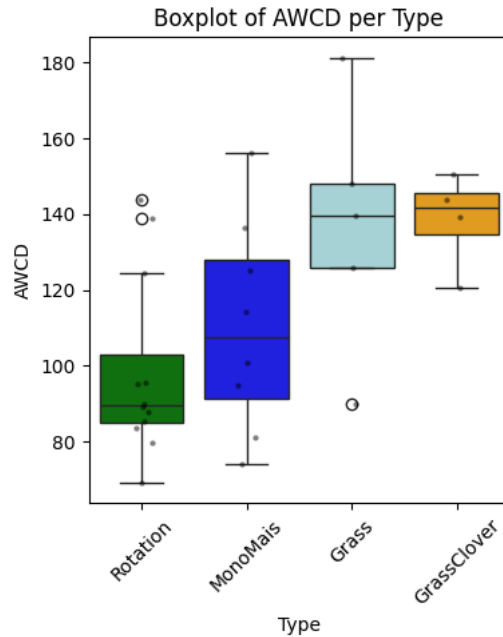
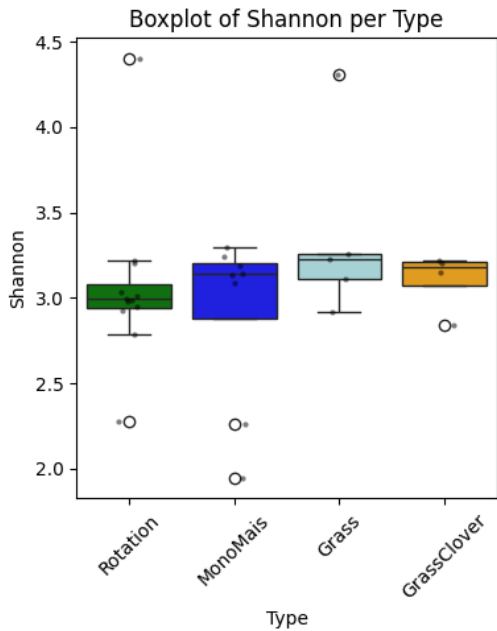
11. Meet de absorptie bij 595 nm met een OMEGA platereader (Fluorostar) direct na inoculatie (0 h) en na 3, 6, 18, 24, 48, 72 en 144 h.

Wat gebeurt er na inoculatie?

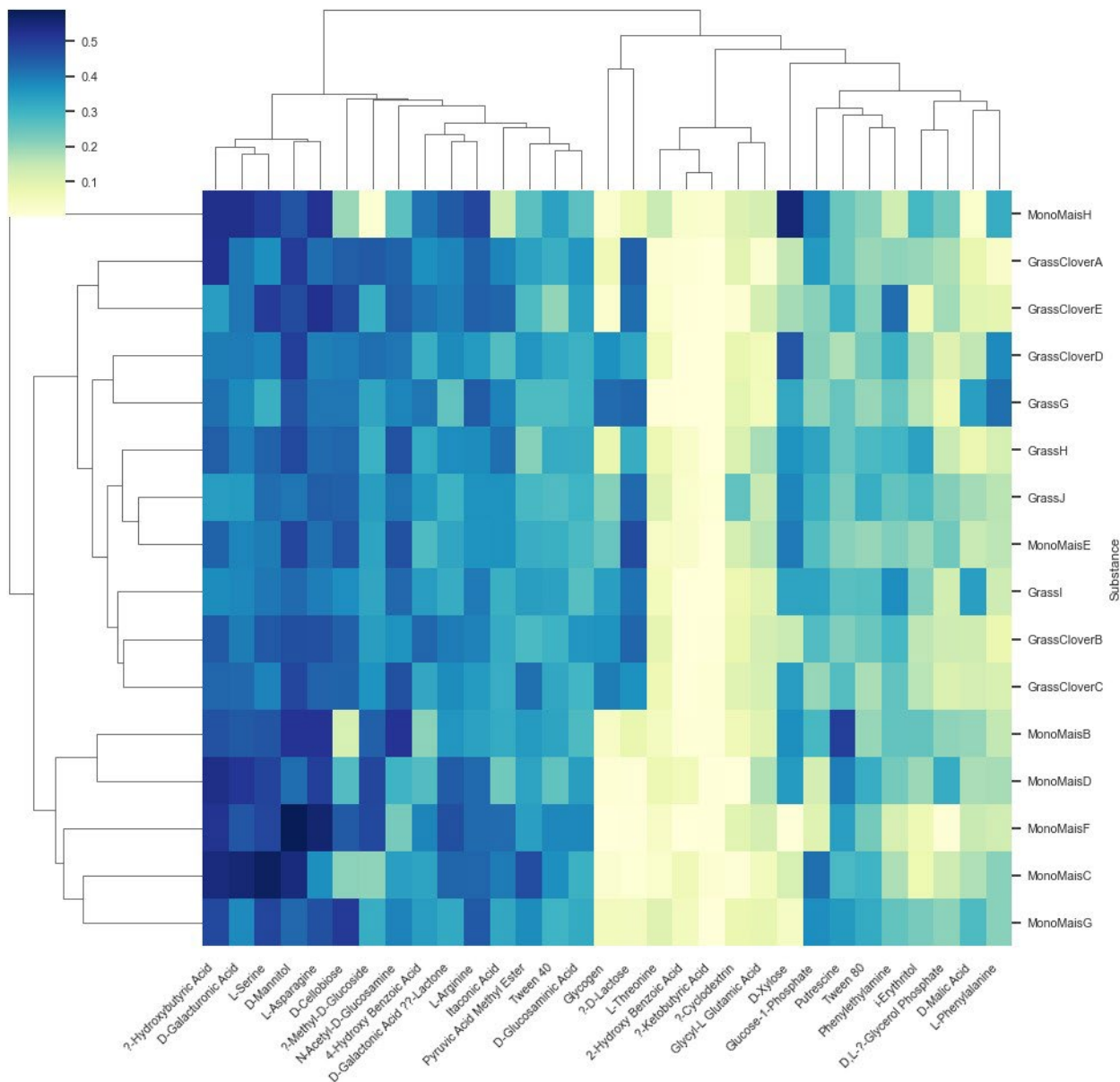
Het patroon van koolstofbron gebruik door de bodemmicro-organismen resulteert in een "fingerprintpatroon" van de bodem voor een bepaalde tijd en conditie. Elk welletje bevat de kleurloze redoxkleurstof tetrazoliumviolet. De assay is gebaseerd op het vermogen van micro-organisme(n) om de koolstofbron te oxideren en op die manier tetrazoliumviolet onomkeerbaar te reduceren tot het paarse, onoplosbare formazan.

POST-LABO VRAGEN

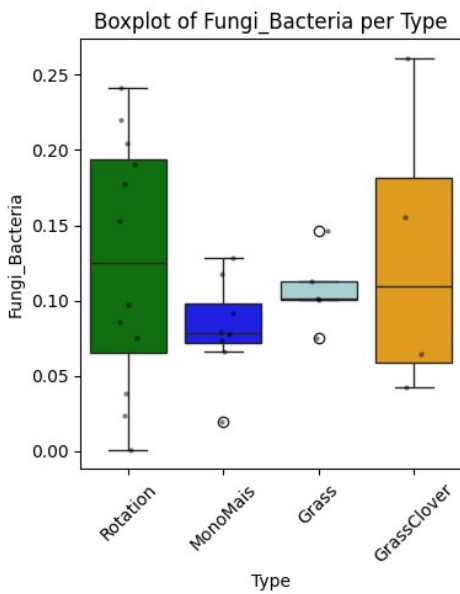
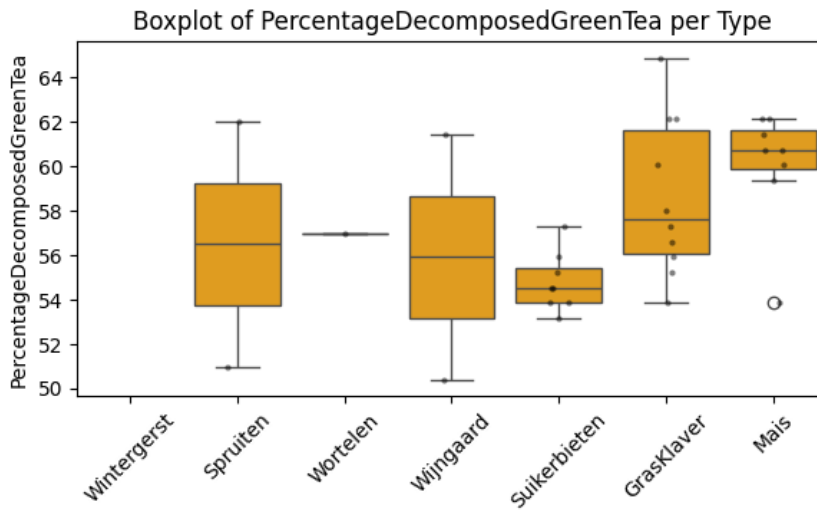
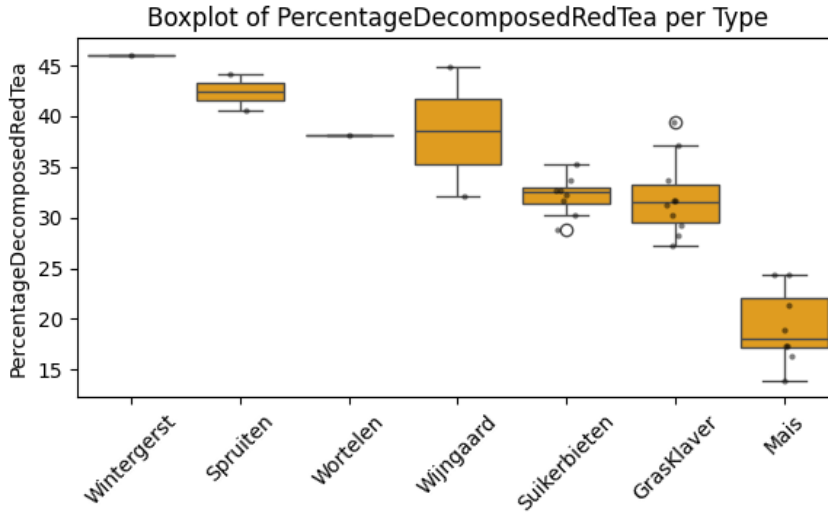
- Met de bekomen fingerprint data (excel), kan je nu een barchart of boxplot maken om de gemiddelde well color density (AWCD) per monster te berekenen. Welk monster heeft de hoogste AWCD-waarde? Wat betekent dat?
- Bekijk onderstaande boxplot. In welke stalen heb je een hogere Shannon diversiteit en AWCD? Kan je verklaringen zoeken waarom?



3. Het onderstaande voorbeeld is een heatmap van de suiker-metabolisatie van zeven monocultuur mais velden, en negen gras/grasklaver. Welke twee suikerbronnen kunnen monocultuur maïs systemen minder of niet gebruiken?



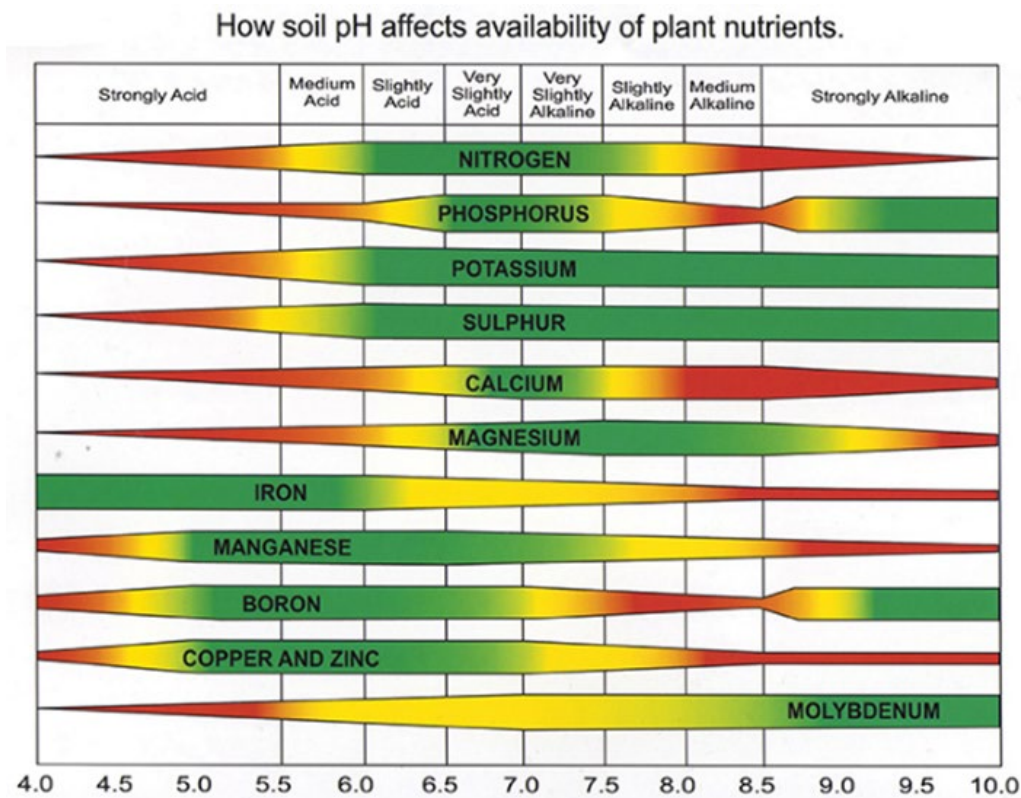
4. De teabag index toont aan dat de afbraak van de rode thee in maïsvelden beduidend trager gaat dan in suikerbieten velden en graslanden. Maar de afbraak van de groene thee gaat het snelst in een maïsveld. De fungi:bacterie verhouding is het laagst in maïs. Kan je nu verklaren waarom de afbraak van de rode thee zou traag gaat in de maïsvelden?



Bodem zuurtegraad

De bodem pH is een meting van de hoeveelheid waterstofionen (H^+) in de bodem. Dit is een extreem belangrijke bodemeigenschap die invloed heeft op de beschikbaarheid van nutriënten en andere stoffen, ook heeft het een invloed op de activiteit van micro-organismen. De pH schaal gaat van 0 tot 14, bodem pH's schommelen van extreem zure (pH 2-3) tot extreem basische bodems (pH 11-12). Omdat pH wordt gedefinieerd als de negatieve decimale logaritme van $[H^+]$, betekent elke stijging van één eenheid in pH een 10-voudige toename van de werkelijke H^+ concentratie. De meeste bodems hebben een pH tussen 4,5 (sterk zuur voor bodems) en 8,5 (medium alkalisch). De beste plantengroei vindt plaats binnen een pH-bereik van 6 tot 7 (in licht zure tot neutrale bodems); echter, sommige planten gedijen in een alkalische omgeving terwijl anderen de voorkeur geven aan meer zure bodems. Bodems met extreme pH's worden meestal gecorrigeerd worden om een productieve bodem te verkrijgen.

Tussen welke pH ranges zijn de beschikbaarheid van N, P, K, S, Ca, Mg door de plant het grootst?



BODEM pH BENCH PROTOCOL

Klas materialen

- 50 ml falconbuisjes
- Gaas, trechter voor de voorbereiding

Materialen per groep

- 50 ml falconbuisjes
- Trechter brede opening en filters
- Filtermembraan
- pH-test strips
- ...

Procedure:

1. Plaats 1 tot 3 theelepels bodem in een falconbuisje
2. Vul de falcon met gedestilleerd water tot hetzelfde niveau als de bodem
3. Roer, schud of wervel de monster krachtig gedurende een minuut. Na deze beweging moet het monster minimaal 30 minuten rusten voordat u verder gaat.
4. Houd een filter over de tweede falcon en giet het monster door het filter om de vaste bodemdeeltjes op te vangen maar de vloeistof door te laten.
5. Dompel de pH-teststrip onder in de oplossing in de tweede falcon.
6. Vergelijk de kleur op de pH-teststrip met de kaart die door de fabrikant is verstrekt om de pH van het monster te bepalen.

Hoe kunnen we de pH van de bodem beïnvloeden?

Welke mineralen en meststoffen kunnen worden toegevoegd:

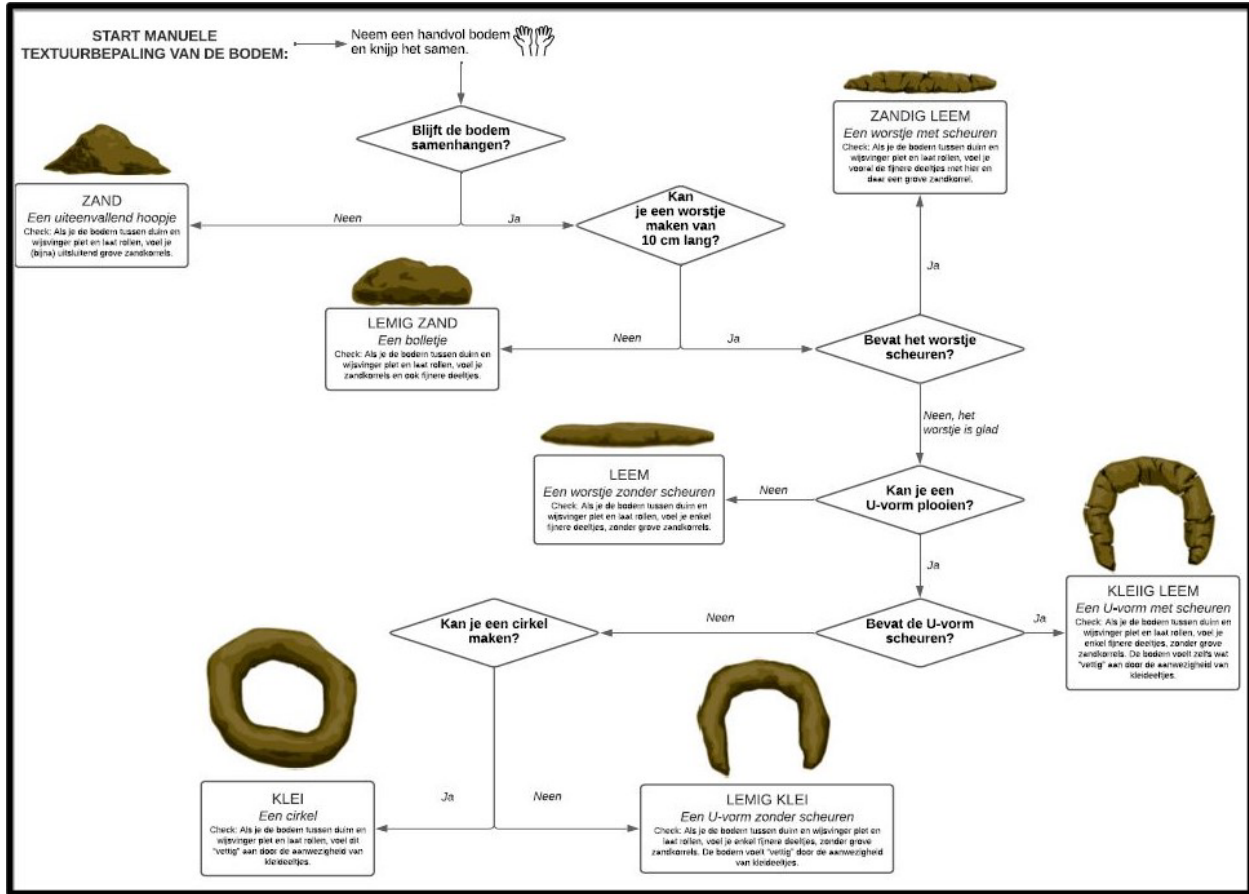
- a) Om van zuur naar neutraal te gaan
- b) Om van basisch naar neutraal/licht zuur te gaan?

Bodem textuur

Bodemwetenschappers zullen vaak bodems classificeren als ruw, fijn, lemig, licht of zwaar. Deze termen beschrijven allemaal de textuur van de bodem. Deze bodemtextuur is een zeer belangrijke bodemeigenschap die refereert naar de relatieve proporties sand, silt, en kleipartikels in de fijnere fracties van de bodem. Kennis over deze bodemtextuur is van cruciaal belang voor het begrijpen hoe een bodem zich gaat gedragen en hoe we het best met dat type bodem om gaan. Denk maar aan soms zware overstromingen in gebieden met veel klei bij hevige regenval, of droogte bij zandbodems waar het water zich snel doorheen de bodem zal verplaatsen. Deze textuur bepaald ook de porositeit van de bodem, deze zal dus bepalen hoe veel water de bodem kan vasthouden en hoe snel het water zich door de bodem verplaatst, dit heeft dan weer een invloed op welke planten erop kunnen groeien.

BODEM TEXTUUR BENCH PROTOCOL

1. Neem een flinke handvol grond. Haal grove fragmenten en grote stukken organisch materiaal eruit en gooi ze weg. De grond moet net vochtig zijn, voeg daarom druppelsgewijs water toe en kneed de grond met de vingers van je andere hand totdat je een vochtige, bewerkbare massa hebt verkregen.
2. **Korreligheidstest:** Wrijf de grond tussen je vingers. Als er zand aanwezig is, voel je een "korreligheid": je kunt de individuele korrels voelen. Het bepalen of zand meer of minder dan 50% van het monster uitmaakt, is de eerste beslissing in de sleutel.
3. **Vochtige casting-test:** Druk wat vochtige grond samen door het in je hand te knijpen. Als de grond bij elkaar blijft (d.w.z. een "afgietsel" vormt), test dan de duurzaamheid van het afgietsel door het van hand tot hand te gooien. Hoe langere heet intact blijft, hoe meer klei aanwezig is.
4. **Plakkerigheidstest:** Bevochtig de grond grondig en druk deze samen tussen duim en wijsvinger. Bepaal de mate van plakkerigheid door op te merken hoe sterk de grond aan duim en wijsvinger blijft plakken wanneer de druk wordt losgelaten, en hoeveel het uitrekt. Plakkerigheid neemt toe met de klei-inhoud.
5. **Wormtest:** Rol wat vochtige grond tussen de handpalmen om de langste, dunste worm mogelijk te vormen. Hoe meer klei aanwezig is, hoe langer, dunner en duurzamer de worm zal zijn.
6. Volg de **sleutel** hieronder om te bepalen welk bodemtype het is:



Kationuitwisselingscapaciteit

De samenstellende delen van een bodem bepalen hoe de bodem functioneert binnen een landschap. Er zijn 3 hoofd bodembestanddelen: levende materie, water/lucht poriën en vast materiaal (mineralen en organische stof). Elk van deze groepen beïnvloedt het functioneren van de bodem.

Organisch materiaal bestaat uit de verrottende resten van planten, bodemorganismen en bovengrondse organismen die binnen de bodem zijn afgezet. Organisch materiaal [OM] komt in vele vormen en maten voor, omdat het gecompliceerde en vaak langdurige proces van ontbinding door bacteriën, schimmels en vele andere levensvormen ondergaat. Deze stukken OM hebben veel negatief geladen sites die binden met kationen (calcium, magnesium, kalium) die de bodem binnendringen en door de bodem reizen in oplossingen.

In deze proef gaan we gebruik maken van Methyleen Blauw om de kationenabsorptiecapaciteit van de bodems te demonstreren. De kleurstof opgelost in water wordt door de bodem gegoten, waar de kleurstof zich bindt met de negatieve receptoren van de bodem. Een bodem met de meeste bindingsplaatsen heeft een hogere kationenuitwisselingscapaciteit en is daardoor een beter filter voor veel potentiële verontreinigende stoffen die door bodems reizen. De bodem met een hogere CEC zal meer van de kleurstof verwijderen, waardoor er helderder vloeistofafloop ontstaat. Het is een eenvoudige visuele demonstratie van CEC.

Leerdoelen:

- Begrip van de samenstellende delen van de bodem.
- Basiskennis van scheikunde.
- Begrip van de bodemfunctie als filter voor water.

CEC BENCH PROTOCOL

Klas materialen

- marker
- Methyleenblauw
- bekers

Materialen per groep

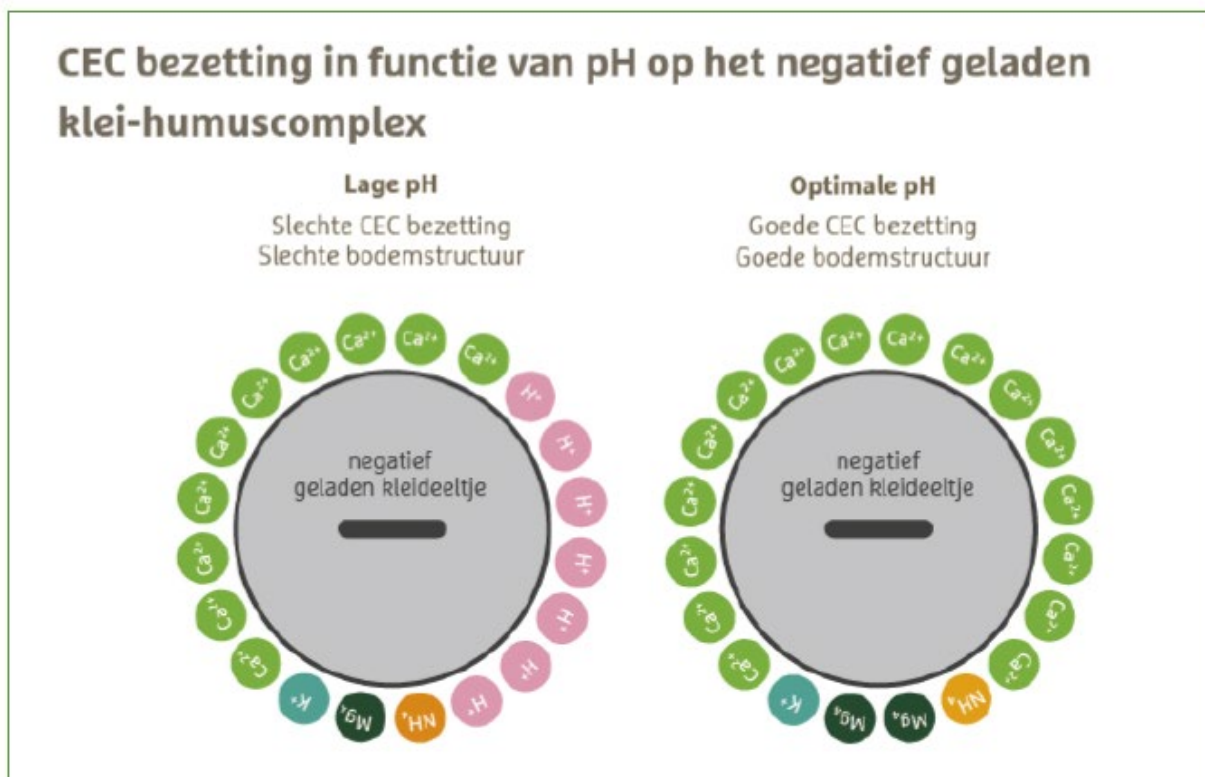
- Steriele falcon tubes
- Filtermembraan
- ...

Stappen:

- Meng ½ theelepel Methyleen Blauwe kleurstof in 500 ml koud water.
- Verdeel dit in 2 porties van 250 ml in de maatcilinders.
- Plaats de voorgevouwen keukenrol in de trechter en plaats deze in twee hoge maatbekers.
- Neem een gelijke hoeveelheid grond ~8 eetlepels verkruimelde grond van beide monsters in de keukenrol.
- Giet de kleurstof door elk van de bodems. Het kan even duren voordat de kleurstof wordt opgenomen, wees geduldig en vul bij wanneer er ruimte is, probeer te voorkomen dat het over de rand loopt of langs de zijkant van de keukenrol ontsnapt.
- Let op zowel de tijd die nodig is voor de kleurstof om door de monsters te bewegen als het verschil in helderheid van de vloeistof die in de maatbeker verschijnt. Hoe helderder de vloeistof, hoe meer kleurstof er is geabsorbeerd op de bodemdeeltjes.

POST-LABO VRAGEN

7. Welke zijn de ideale ranges (%) van Ca-CEC, Mg-CEC, K-CEC, Na-CEC, H-CEC voor een zandgrond en zandleem in Limburg. Bespreek a.d.h.v. onderstaande figuur, de gevaren die er zijn bij een te zure pH op de mineralenbalans.



Figuur: CEC van agrarische bodemanalyses

Bodem organische stof

Bodemorganische stof is een complexe en gevarieerde mengeling van verschillende organische stoffen. Het omvat levende biomassa, dode plantenresten en opnieuw gesynthetiseerde organische verbindingen van variërende complexiteit. Organische stof is een essentieel bestanddeel van de bodem. Het beïnvloedt eigenschappen zoals kationenuitwisselingscapaciteit, zuurgraad en buffering, structuur, voedingsstofgehalte, waterretentie, thermische geleidbaarheid, warmtecapaciteit en biologische activiteit.

De koolstof (C) concentratie in bodemorganische stof is relatief constant, vaak aangenomen als gemiddeld 58% (massabasis), d.w.z. 0,58 kg C /kg droge organische stof. Zo kan de concentratie organische stof in de bodem worden geschat door de concentratie organisch koolstof te delen door 0,5.

De totale organische stofinhoud wordt geschat door het meten van het gewichtsverlies tijdens verbranding (gewichtsverlies bij ontsteking), het meten van de CO₂-productie tijdens verbranding (droge verbranding), of het meten van C dat vrijkomt tijdens chemische oxidatie in oplossing (natte oxidatie).

Gewichtsverlies bij ontsteking

Voor deze methode wordt organische stof gekwantificeerd met thermogravimetrie (TGA). Hierbij wordt de organische stof verwijderd door verbranding van het bodemmonster in een moffeloven. De stof die na ontsteking overblijft, wordt as genoemd en bestaat uit anorganische bestanddelen zoals mineralen. Het verschil tussen het oorspronkelijke gewicht en het asgewicht vertegenwoordigt de organische stofinhoud. De bodem moet droog zijn en de verbrandingstemperaturen liggen meestal tussen 350°C en 600°C. U zult deze methode gedetailleerd zien tijdens het laboratoriumpracticum na de monsternamen in het nationale park.

Droge verbranding

Door de hoeveelheid geproduceerde CO₂ tijdens verbranding te meten, kan men het totale C evalueren en de organische stofinhoud van een monster berekenen. Speciale inductieovens zijn ontworpen om deze methode niet alleen voor bodemanalyse te gebruiken, maar ook voor

C-analyse in andere materialen, zoals plantenbiomassa. Net als gewichtsverlies bij ontsteking is droge verbranding niet geschikt voor kleirijke en kalkhoudende bodems.

Natte oxidatie

Er zijn verschillende procedures die kunnen worden gebruikt om organische stof en organisch C te evalueren door middel van natte (in oplossing uitgevoerde) chemische oxidatie. Een van deze methoden is de Walkley-Black-methode, die geschikt is voor een breed scala aan bodems, waaronder kalkhoudende bodems. In deze methode wordt kaliumdichromaat ($K_2Cr_2O_7$), in sterke zuuroplossing, gebruikt om bodemorganische stof te oxideren. Nadelen van de methode zijn veiligheidsrisico's en vereisten voor het afvoeren van chemisch afval.

In dit practicum meten we niet de totale organische stof, maar eerder de labiele, biologisch actieve fractie. De labiele fracties van bodemorganische stof worden vaak het actieve koolstofpool genoemd, om het te onderscheiden van het grootste deel van de bodemkoolstof, dat behoort tot een zeer ondoordringbare of passieve koolstofpool die slechts zeer langzaam wordt veranderd door microbiële activiteiten. Fracties van bodemorganische stof die worden beschouwd als de actieve koolstofpool, en dienen als gevoelige indicatoren van veranderingen in door management geïnduceerde bodemkwaliteit, omvatten microbiële biomassa C, deeltjesvormige organische stof en bodemkoolhydraten gemeten als antrone-reactief C. De methode berust op oxidatie van organische stof door $KMnO_4$, en wordt beschreven door Weil et al. (2003). Vanwege de methodologie wordt deze labiele fractie ook wel de Permanganaat-Oxideerbare Koolstof (POXC) genoemd.

ORGANISCHE C BENCH PROTOCOL

Klas materialen

- 50 ml centrifuge buizen
- 0.2M KMnO₄ oplossing
- Optioneel: Spectrofotometer + cuvetten
- Optioneel: Schudincubator

Materialen per groep

- 50 ml centrifuge buizen
- Rekje voor 50 ml buizen
- 0.2M KMnO₄
- Gedestilleerd water (of gewoon kraanwater)
- Bodemstaal
- 100-1000 μ l pipetten en tips
- Timer

Vorbereiding

1. Label twee 50 mL centrifugebuizen voor elk bodemmonster. Weeg 2,50 gram (\pm 0,05 g) verse bodem af in een van de centrifugebuizen.
2. Voeg 18,0 mL gedestilleerd water toe aan elk van de centrifugebuizen met de bodem. Voeg met de 100-1000 μ L pipet 2 mL 0,2 M KMnO₄-voorraadoplossing toe aan elke buis.
3. Bereid een standaardoplossing ("blank") voor door 18,0 mL gedestilleerd water en 2,0 mL 0,2 M KMnO₄-voorraadoplossing aan een centrifugebuis (zonder bodem) toe te voegen en verwerk deze op dezelfde manier als de onbekende bodems.
4. Draai de doppen snel en stevig op de buizen en schud elke buis krachtig met de hand gedurende 2 seconden om ervoor te zorgen dat de bodem gelijkmatig in de oplossing wordt verdeeld.
5. Plaats de buizen op een schudder en schud ze met 240 oscillaties per minuut gedurende 2 minuten. Indien geen schudincubator, kan je ook met de hand schudden.
6. Na 2 minuten, verwijder de monsters van de schudder en draai of schud de buis krachtig om ervoor te zorgen dat er geen bodem aan de zijkanten of dop van de buis blijft kleven. Verwijder op dit punt de doppen om verdere verstoring van de bodem

na bezinking te voorkomen. Plaats de monsters op een donkere plek en laat de bodem tien minuten bezinken. Bezinkingstijd is een kritieke stap, dus een timer is essentieel.

Monsterverdunning

1. Terwijl de monsters bezinken, voeg 24,75 mL gedestilleerd water toe aan de tweede set centrifugebuizen. Zodra de tien minuten durende bezinkingstijd is verstreken, breng je snel 0,25 mL supernatans (zonder enige deeltjes) over naar de tweede buis met 24,75 mL water. Let op: deze stap moet zo snel mogelijk worden uitgevoerd omdat het permanganaat blijft reageren met de bodem zolang het in contact blijft
2. Draai de doppen op de tweede set buizen en draai ze om te mengen. Dit zijn de uiteindelijke monsteroplossingen voor analyse. Ze zijn stabiel gedurende maximaal 24 uur als ze in het donker worden bewaard.

Evaluatie (visueel)

1. Bekijk en vergelijk de intensiteit van de kleur van de stalen. De hoeveelheid koolstof die wordt geoxideerd is een functie van de hoeveelheid permanganaat die wordt verminderd. Hoe hoger de permanganaatoxideerbare koolstofwaarden, hoe lager de intensiteit van de kleur van de oplossing. Dus hoe meer koolstof je bodemstaal bevat, hoe minder roos de kleur van de oplossing is.

Evaluatie: standaardcurve en spectrofotomete

Verdunning van standaarden

- Voeg 24,75 mL gedestilleerd water toe aan vier 50 mL centrifugebuizen
- Breng 0,25 mL van elke van de vier standaardoplossingen over (voor u bereid, 0,005; 0.01; 0.015 en 0,02 M KMnO_4) naar een van deze centrifugebuizen.
- Monsters lezen op de spectrofotometer (Platereader)

Breng 1 ml van alle verkregen oplossingen (definitieve monsteroplossingen, definitieve "blanco" oplossingen en verdunde standaardoplossingen) over naar een cuvet. Schrijf in je notities op wat je aan welk cuvet hebt toegevoegd!

De absorptie bij 550 nm van wordt gelijktijdig gemeten met een UV-VIS spectrofotometer. Informeer de docent wanneer de cuvetten klaar zijn, en hij/zij zal je helpen bij de meting.

Berekening van de massa POXC voor onbekende bodemmonsters

PRINCIPE: De hoeveelheid koolstof die wordt geoxideerd is een functie van de hoeveelheid permanganaat die wordt verminderd. Hoe hoger de POXC-waarden, hoe lager de absorptie (intensiteit van de kleur van de oplossing).

Maak een standaardcurve op basis van de spectrofotometermetingen van de vier standaardoplossingen: de absorptiewaarden op de x-as en de molariteit van de stock KMnO_4 -standaarden op de y-as. Dit moet resulteren in een regressielijn: $y = ax + b$; $R^2 = 0,999$

Gebruik de volgende vergelijking om POXC te bepalen, volgens Weil et al. (2003):

$\text{POXC (mg kg}^{-1} \text{ bodem)} = [0,02 \text{ mol/L} - (a \times \text{Abs} + b)] \times (9000 \text{ mg C/mol}) \times (0,02 \text{ L oplossing/Gewicht})$

Waar: $0,02 \text{ mol/L}$ = beginconcentratie van de oplossing

a = intercept van de standaardcurve

b = helling van de standaardcurve

Abs = absorptie van de onbekende

9000 = mg koolstof geoxideerd door 1 mol MnO_4 , veranderend van Mn^{7+} naar Mn^{4+}

$0,02 \text{ L}$ = volume van de stockoplossing die reageert

Gewicht = gewicht van luchtgedroogd bodemmonster in kg

Opschonen en verwijdering

Het laten staan van de centrifugebuizen met doppen op het werkblad gedurende een week of langer zal ervoor zorgen dat het permanganaat volledig reageert met de bodem en alle paarse kleur verliest. Vloeistof kan dan veilig door de gootsteen worden afgevoerd en buizen met bodem weggegooid of schoongemaakt en hergebruikt. De tweede verdunning van monsters en standaarden bevat zeer weinig KMnO_4 en kan veilig worden weggespoeld met een overvloed aan water.

BODEMSTAAL RAPPORT

Bodemstaal rapport: beschrijving en advies

Proficiat! Je hebt ontdekt welke mesofauna's en microben er leven in je schoolbodem, nu gaan we nog 1 stapje verder. Op basis van de gegevens van de bodembioïologie, zoek op het internet, adviezen om je bodemleven te stimuleren. Vervolledig de tabel hieronder en maak zo je eigen plan voor een betere bodem!

Bodemstaal _____	Informatie; beoordeling:
# en welke mesofauna's zijn er gevonden?	
Zijn er ziekteverwekkende aaltjes/nematoden gevonden?	
Zijn er problemen met de plant/bodem (vb. mager gazon, engerlingen, mos, onkruid, vergeeld gazon, dor, slechte bodemstructuur, te lage pH..)	
Hebben naburige plekje dit ook? Maw verspreidt het probleem zich?	
Waren er verschillen in bodem pH, org koolstof, CEC?	
Stel acties voor om je bodemleven in balans te brengen en/of als het al goed is, hoe ga je het verder onderhouden/verbeteren	
Foto's van de staalname plek	
Internationale websites, adviezen, producten, die kunnen worden toegepast om de bodem te verbeteren	

DATABANK AANVULLEN

Na het vervolledigen van dit practicum, vul dan je gegevens aan in de BODEMLEVEN project databank en vermeld stalen, methodes, protocol notities.

<https://bodemleven.be/scholen/>

Databank met jouw bodemstaal gegevens

Methodes

- Stalen en informatie
- mesofauna resultaten
- bodem fysica resultaten
- Update protocol notities

Referenties:

- Weil RR, Islam KR, Stine MA, Gruver JB, Samson-Liebig SE. 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *American Journal of Alternative Agriculture* 18:3–17.
- Explore Soils: Soil Use. (n.d.). Explore Soils. <https://www.exploresoils.org.uk/use/>
- Food and Agriculture Organization. (n.d.). The importance of soil organic matter: Key to drought-resistant soil and sustained food production. Retrieved from <https://www.fao.org/3/a0100e/a0100e00.htm>
- Bardgett, R., van der Putten, W. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515, 505–511 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Raynaud X, Nunan N (2014) Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. *PLOS ONE* 9(1): e87217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217>
- Louis Bolk Instituut. (n.d.). Bodembreed Interreg, Deel 1: Duurzaam Bodembeheer & Functionele Agrobiodiversiteit in de Bodem. Geraadpleegd van <https://www.louisbolk.nl/publicaties/bodembreed-interreg-deel-1-duurzaam-bodembeheer-functionele-agrobiodiversiteit-de-bodem>

Auteur:

Deze practicum handleiding is samengesteld door Sofie Thijs, post-doc, CMK-UHasselt, en Simon Vandersanden, phd-student CMK-UHasselt.