

Beat Frey, Eidg. Forschungsanstalt WSL, 8903 Birmensdorf

Peter Weisskopf, Urs Zihlmann, Hans-Rudolf Oberholzer, Agroscope, 8046 Zürich

10. Januar 2016

Schlussbericht zuhanden des BAFUs

Fallstudie „Beitrag an die Untersuchung der Regenerierbarkeit von Böden am Beispiel des Golfplatzes Otelfingen“

Ausgangslage

Beim Bau von Golfplätzen werden Terrain-Umgestaltungen vorgenommen. Wenn für den Golfplatzbau Fruchtfootflächen (FFF) bzw. landwirtschaftlich nutzbare Böden beansprucht werden, stellt sich die Frage, inwieweit diese Veränderungen am Bodenaufbau zu langfristigen Beeinträchtigungen der Bodenfruchtbarkeit führen können. Insbesondere muss sichergestellt werden, dass beim Golfplatzbau beanspruchte FFF innerhalb eines Jahres wieder landwirtschaftlich in Kultur genommen werden könnten.

In Otelfingen betreibt die Migros Genossenschaft Zürich einen Golfpark. Beim Bau der Golfplatzweiterung Otelfingen ist aus Bodenschutzgründen eine neuartige Bauweise für Geländemodellierungen angewendet worden, indem Erhebungen direkt auf den gewachsenen Boden geschüttet wurden. Dies erfolgte mit der Absicht, möglichst wenig in den Boden einzugreifen, um ihn im Falle eines Rückbaus möglichst schnell wiederherstellen und beleben zu können. Diese Arbeiten wurden zusammen mit myx als von der Golfplatzbetreiberin beauftragtes bodenkundliches Büro zur Begleitung der Aufschüttungen untersucht.

Mit Blick auf künftige Golfplatzprojekte hat sich die Betreiberin des Golfparkes entschlossen, auf dem Golfplatz Otelfingen beispielhaft zu untersuchen, wie sich die gewählte Bautechnik auf die Regenerierbarkeit der Böden auswirkt. Anhand eines Fallbeispiels auf der Golfplatzweiterung Otelfingen wurde von der Agroscope und der WSL untersucht, in welchem Zustand sich der gewachsene lehmig-tonige Boden nach einer etwa fünfjährigen Überschüttung mit ca. 140 cm Bodenmaterial befindet. Zu diesem Zweck wurde ein beim Golfplatzbau aufgeschütteter Hügel bis auf die Oberfläche des ursprünglichen gewachsenen Bodens abgetragen; in diesem Moment erfolgte eine erste Serie von Bodenuntersuchungen (1. Termin: „Ausgangszustand“). Danach wurde eine regenerative landwirtschaftliche Bewirtschaftung umgesetzt (Abbildung 1). Dabei wurde der Boden zunächst bis auf vorgegebene Tiefen mit unterschiedlicher Intensität mechanisch gelockert (Grundbodenbearbeitung mit Grubber bis auf knapp 30 cm Tiefe, intensive Saatbettbereitung mit Kreiselegge bis auf ca. 15 cm Tiefe), anschliessend erfolgte die Einsaat einer besonders intensiv wurzelnden Wiesenmischung

(mit Luftstickstoff speichernden Luzernepflanzen). Im weiteren wurde untersucht, wie sich die Bodeneigenschaften im Verlauf der ersten vier Monate einer regenerativen Bewirtschaftung entwickeln. Bei diesen Untersuchungen wurden Bodeneigenschaften erfasst, die in kurzer Zeit beurteilt bzw. analysiert werden können und für Bodenorganismen bzw. Pflanzen funktionell wichtige Aussagen ergeben. Deshalb wurden visuelle Analysen des Strukturaufbaues im Feld sowie Laboranalysen der mikrobiellen Biomasse und des Auftretens Methan-produzierenden Populationen im Verlauf nach einer viermonatigen Regenerationsphase untersucht (Abbildung 1). Diese Populationen produzieren unter sauerstoffarmen Bedingungen Methan und sind somit Zeiger für ungünstige (verdichtete) Bodenverhältnisse (Frey et al. 2011; Frey und Hartmann 2013). Die Ergebnisse der ersten vier Monate einer regenerativen Bewirtschaftung wurden in einem Bericht zusammengefasst (Weisskopf et al. 2014).



Abbildung 1. Die Situation beim Regenerationsversuch Golfplatz Otelfingen vor und während der regenerativen Bewirtschaftung. Bilder oben im März 14 und Mai 14 während der Freilegung der verdichteten Böden. Bilder unten während einer frühen (Juli 14) und einer späteren (Oktober 14) Regenerationsphase.

Projektziele

Mit der vorliegenden Studie soll untersucht werden, wie sich die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften in einem beim Golfplatzbau überschütteten Boden von seiner Freilegung bis zum Abschluss einer zwölfmonatigen Regenerationsphase entwickelt. Die mikrobiellen Gemeinschaften sollen an fünf Zeitpunkten während der Regenerationsphase detailliert untersucht und mit dem nicht durch Baumassnahmen beeinflussten Vergleichsboden verglichen werden. Anhand von mikrobiellen Zeigern

(Indikatorenarten) soll abgeschätzt werden, ob die verdichteten Böden noch beeinträchtigt sind oder ob sich nach der regenerativen Bewirtschaftung bereits spürbare Verbesserungen der Bodeneigenschaften bemerkbar machen.

Die Ziele dieser Studie waren die folgenden:

- Untersuchung des durch ein Golfplatzelement beeinflussten Bodens und des ungeschädigten Vergleichsbodens vor („Status“) und nach („Ende“) der einjährigen landwirtschaftlichen Regenerationsphase.
- Analyse des Bodenmikrobioms (Bakterien, Pilze) mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung.
- Analyse der Resistenz und Resilienz des Bodenmikrobioms in den verdichteten Böden nach regenerativer Bewirtschaftung. Fragen: Welche Taxa sind resistent in verdichteten Böden und welche erholen sich mit der regenerativen Bewirtschaftung?
- Analyse von mikrobiellen Zeigern (z.B. Methan-produzierenden Populationen) für verdichtete Böden nach der einjährigen Regenerationsphase, um den Erfolg der Regeneration abzuschätzen.

Wir verfolgten die folgende **Hypothese**: Falls mikrobielle Zeiger für Verdichtungen wie z.B. Methan-produzierende Populationen nach einer einjährigen Regenerationsphase im Boden noch erhöht vorkommen würden, wären die Bodeneigenschaften weiterhin ungünstig für sauerstoffliebende Organismen wie Wurzeln und Mykorrhizapilze und somit die Kulturpflanzen. Falls aber diese Zeiger für Verdichtungen nach einer einjährigen Regenerationsphase reduziert wären, würde dies auf eine erfolgreiche Regeneration der Bodeneigenschaften hindeuten (z.B. bessere Durchlüftung und Sauerstoffverfügbarkeit). Dadurch könnte der Erfolg der Regeneration abgeschätzt werden (Frey 2015).

Methodisches Vorgehen

An fünf Zeitpunkten (Status „Beginn“ kurz vor den praktischen Regenerationsarbeiten; 1, 2, 4 und 12 Monate nach den Regenerationsarbeiten) wurden Bodenproben in den regenerierten und den ungeschädigten Vergleichsstandorten genommen. Die Probenahmen starteten im Mai 2014 und waren im Mai 2015 abgeschlossen. Insgesamt wurden 60 Bodenproben (3 Behandlungen: Verdichtete Böden aber mit regenerativer Bewirtschaftung; Ungeschädigter Vergleichsboden (Kontrolle); Ungeschädigter Vergleichsboden aber mit regenerativer Bewirtschaftung/ 5 Zeitpunkte / 4 Replikate) in einer Tiefe von 0 – 20 cm mit einem Bohrer (5 cm Durchmesser) entnommen. Die Proben wurden durch ein 2mm Sieb homogenisiert und pro Probe wurden 500 mg frisch gesiebter Boden in DNS Extraktionspuffer eingewogen und eingefroren.

In diesen Proben wurde die Erbsubstanz (Nukleinsäuren, DNS) extrahiert und quantifiziert. Mittels phylogenetischer Markergene amplifizierten wir Prokaryoten (Bakterien, Archaea) und Pilze aus der extrahierten DNS. Danach wurde das Bodenmikrobiom (=alle in der Bodenprobe vorhandenen Bakterien, Archaea und Pilze) mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung (Illumina MiSeq Plattform) untersucht. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mittels einer bioinformatischen Pipeline analysiert. Diese Analysen erlaubten es uns, die Diversität, Struktur, und den Verwandtschaftsgrad der mikrobiellen Populationen im Boden und die Zusammenhänge veränderter mikrobieller Diversität und Bodeneigenschaften zu bestimmen. Die Abundanz der Bakterien (16S rRNA Genkopien) und Pilze (ITS2 rRNA Genkopien) im Boden wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Das

Auftreten des funktionellen Markergens *mcrA* (Methyl coenzyme M reductase A) stellvertretend für die Anzahl Methan-produzierender Populationen im Boden wurde ebenfalls mittels quantitativer polymerase chain reaction (PCR) nachgewiesen.

Ergebnisse

Im folgenden werden nur die Ergebnisse der 2 folgenden Verfahren beschrieben:

VR = Verdichtete Böden aber mit regenerativer Bewirtschaftung (verdichtet-regeneriert)

KO = ungeschädigte Vergleichsböden (Kontrolle)

DNS Gehalte im Boden (als Proxy für die mikrobielle Biomasse im Boden)

DNS wurde aus dem Boden von verdichteten und ungeschädigten Flächen isoliert. Die DNS Gehalte im Boden liefern eine Information über den Pool leicht umsetzbarer Biomasse (mikrobielle Biomasse). Generell waren die DNS-Gehalte in den ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle) doppelt so hoch wie in den verdichteten Böden (Abbildung 2). Aber die DNS-Gehalte im Boden wurden durch die zwölfmonatige regenerative Bewirtschaftung positiv beeinflusst (Abbildung 2). Die DNS-Gehalte in den verdichtet-regenerierten Böden erholten sich leicht mit der Bodenbearbeitung und Entwicklung von Wurzeln. Gleichzeitig erhöhten sich auch die DNA-Gehalte in den ungeschädigten Vergleichsböden. Aber die DNS-Gehalte in den verdichteten Böden waren immer noch signifikant tiefer als in den ungeschädigten Vergleichsböden.

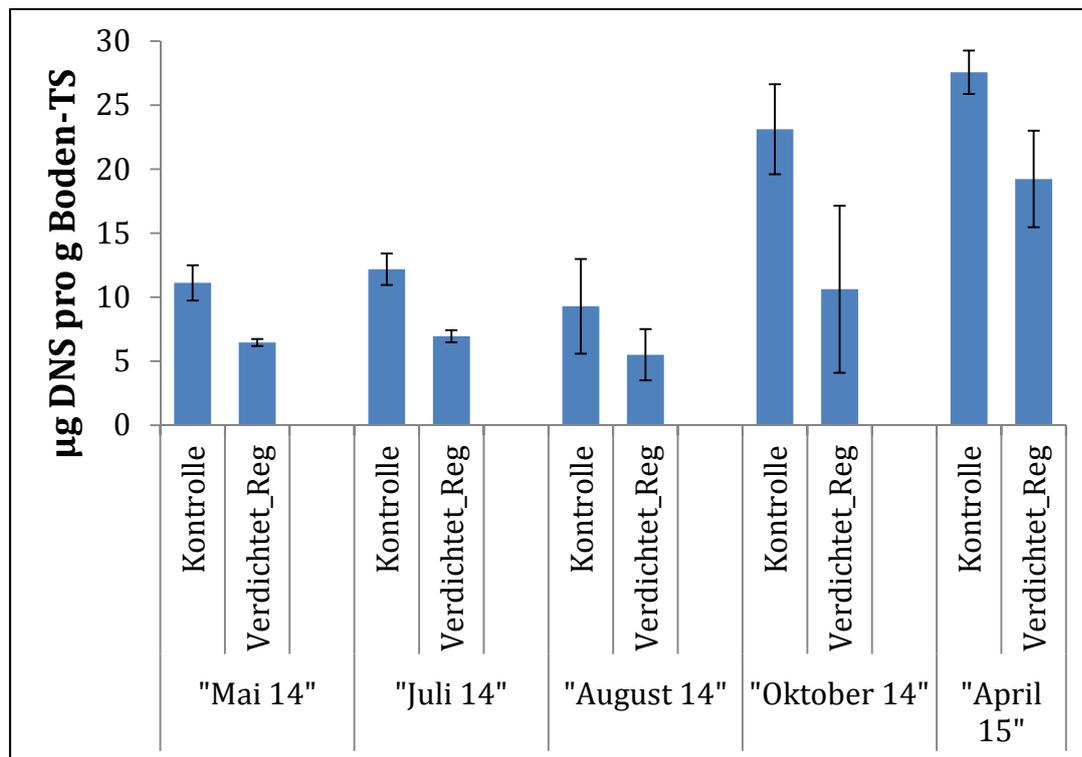


Abbildung 2: Menge an extrahierbarer mikrobieller Erbsubstanz (DNS) im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Reg) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung.

Abundanz von Bakterien (16S rRNA Genkopien)

Die Abundanz war durch die Verdichtung kaum beeinflusst (Abbildung 3). Generell waren die 16S rRNA Genkopien in den ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle) nur leicht höher als in den verdichteten Böden. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Bakterienanzahl im Boden wenig beeinflusst wird durch eine Verdichtung, was in guter Übereinstimmung mit früheren Arbeiten steht (Hartmann et al. 2014). Einzig an einem Zeitpunkt (im Oktober 14 nach 6 Monaten) war die Abundanz in den Vergleichsböden signifikant höher als in den verdichteten Böden. Nach einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung waren die 16S rRNA Genkopien in den verdichteten Böden leicht höher als in den ungeschädigten Vergleichsböden (Abbildung 3).

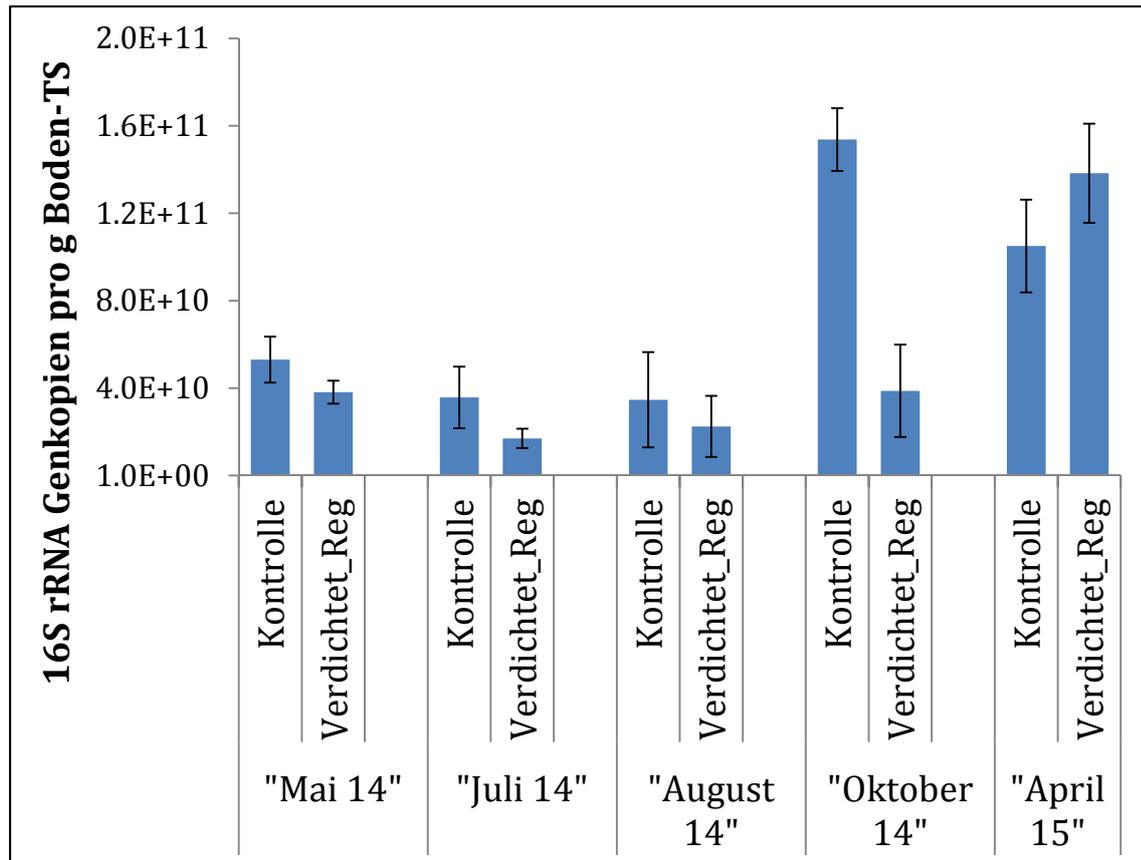


Abbildung 3: Abundanz von Bakterien (Anzahl 16S rRNA Genkopien) im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Reg) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung.

Abundanz von Pilzen (ITS2 Genkopien)

Pilze reagierten empfindlicher auf Verdichtung als die Bakterien. Bereits bei der ersten Beprobung im Mai 2014 waren die Anzahl Pilze (ITS2 Genkopien) in den verdichteten Böden (Verdichtet_Reg) stark reduziert (Abbildung 4). Gemäss eigenen Untersuchungen (Hartmann et al. 2014) reagieren Pilze empfindlicher auf ein anaerobes (sauerstofflimitiertes) Bodenmilieu. Interessanterweise erholten sich die ITS2 rRNA Genkopien in den verdichteten Böden (Verdichtet_Reg) nach einer zwölfmonatigen Regenerationsphase und waren gleich hoch wie in den ungeschädigten Vergleichsböden. Die Pilze haben sich in den verdichteten Böden durch die Bodenbearbeitung und Entwicklung von Wurzeln nach einem Jahr erholt. Dies bedeutet, dass die

Bodeneigenschaften günstiger für sauerstoffliebende Organismen wie Wurzeln und Mykorrhizapilze geworden sind (z.B. bessere Durchlüftung und Sauerstoffverfügbarkeit). Vor allem die molekulargenetischen Analysen zeigten, dass die arbuskulären Mykorrhizen durch die Bepflanzung mit Luzerne gefördert wurden.

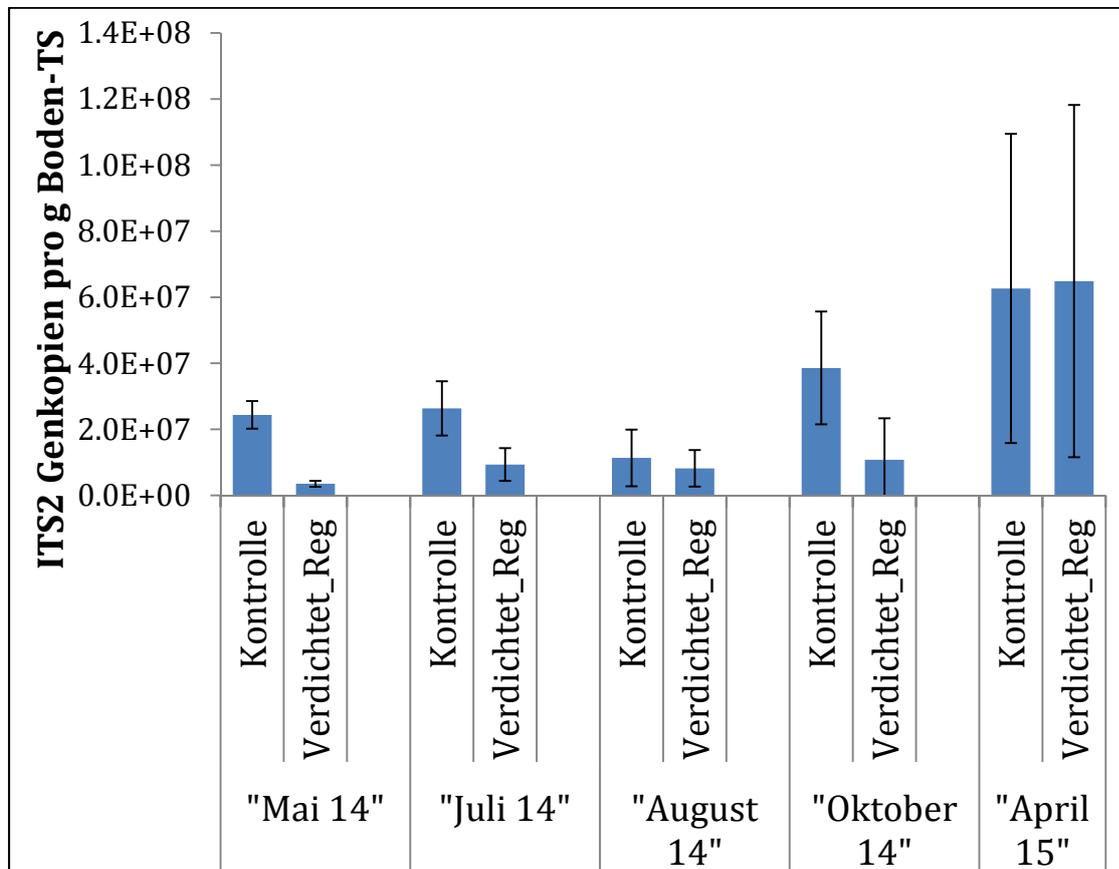


Abbildung 4: Abundanz von Pilzen (Anzahl ITS2 RNA Genkopien) im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Reg) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung.

Auftreten von Methan-produzierenden Populationen im Boden (mcrA Genkopien)

Die Methan-produzierenden Populationen im Boden wurden mittels des funktionellen Markergens *mcrA* (Methyl coenzyme M reductase A) nachgewiesen. Nur die Methan-produzierenden Arten im Boden besitzen das *mcrA* Gen, was wir mittels quantitativer PCR nachweisen können. Wir untersuchten, ob die Methan-produzierenden Populationen in den Böden unter Aufschüttung vorhanden sind und ob diese „ungünstigen“ Arten nach Bodenabtrag und Bepflanzung verschwinden. Das Auftreten von Methan-produzierenden Populationen im Boden ist ein guter Indikator für lebensfeindliche Bedingungen (stark anaerobe Verhältnisse -- Schaden) im Boden (Frey et al. 2011; Frey et al. 2013). Die *mcrA* Genkopien in den ungeschädigten Vergleichsböden waren tief und kaum nachweisbar (Abbildung 5). Dagegen waren die *mcrA* Genkopien in den verdichteten Böden nachweisbar. Insbesondere in den verdichteten Böden unter Aufschüttung (Ausgangszustand, Mai 14) waren die Methan-produzierenden Populationen stark angereichert (Abbildung 5).

Daraus folgern wir, dass die verdichteten Böden sehr schlecht durchlüftet waren und lebensfeindliche Bedingungen für sauerstoffliebende Mikroorganismen und Pflanzenwurzeln herrschten.

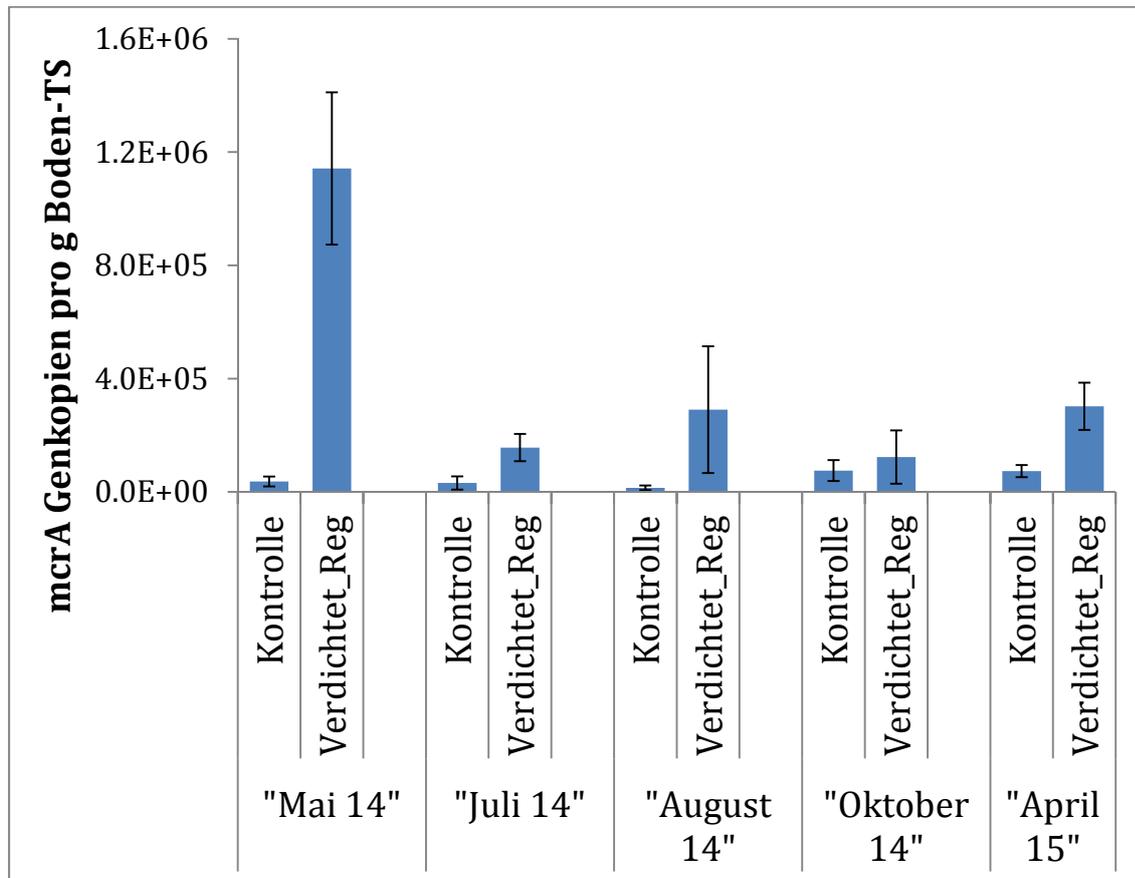


Abbildung 5: Auftreten des funktionellen Markergens *mcrA* (Methyl coenzyme M reductase A) für Methanproduzierende Populationen im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Reg) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung. Generell waren die Anzahl Genkopien des *mcrA* Markergens in den verdichteten Böden höher als in den ungeschädigten Vergleichsböden.

Interessanterweise nahm die Anzahl der *mcrA* Genkopien während der zwölfmonatigen Regenerationsphase signifikant ab. Die tiefsten Werte wurden im Oktober 14 nach der viermonatigen Regenerationsphase gemessen, wobei die Werte auf das Niveau der ungeschädigten Vergleichsböden fielen (Abbildung 5). Über den Winter wurde aber wieder ein signifikanter Anstieg der *mcrA* Genkopien in den verdichteten Böden gemessen. Wir vermuten, dass der strukturelle Bodenzustand nach einer einjährigen Regenerationsphase noch nicht das Ausgangsniveau erreicht hat (Weisskopf et al. 2014). Es ist daher möglich, dass bei einer nicht vollständigen Bodenstruktur die verbleibenden strukturellen Beeinträchtigungen sich erst während der nassen Wintersaison wieder deutlicher bemerkbar machten (eingeschränkter Gasaustausch, Sauerstoffmangel). Generell fand aber eine starke Abnahme der Methanproduzierenden Arten in verdichteten Böden (Verdichtet_Reg) gegenüber dem Ausgangszustand im Mai 2014 (Start) statt. Wir vermuten daher, dass das Bodenmilieu für die Methanproduzierenden Populationen durch die zwölfmonatige regenerative Bewirtschaftung ungünstiger wurde. Oder anders ausgedrückt, dass eine verbesserte Bodenstruktur zu einem günstigeren Bodenmilieu für aerobe Lebensprozesse führte.

Analyse des Bodenmikrobioms (Bakterien, Archaea, Pilze) mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung

Total wurden 2'921'000 bakterielle und 3'763'000 pilzliche Sequenzdaten analysiert. Nach der Qualitätskontrolle wurden 508'000 bakterielle und 1'683'000 pilzliche Sequenzen für die Analysen weiterverwendet. Es wurden im gesamten Datensatz 4211 verschiedene bakterielle operationelle taxonomische Einheiten (OTUs) und 2029 pilzliche OTUs in Otelfingen gefunden. Im Durchschnitt wurden 1940 bakterielle OTUs und 493 pilzliche OTUs in einer Bodenprobe gefunden. Ein OTU entspricht generell einer Art. Diese Anzahl Arten erwarten wir in anderen vergleichbaren Böden.

Bei den Prokaryoten überwogen die Bakterien (99.09% des ganzen Datensatzes). Archaea waren nur schwach vertreten (0.91%). Bei den Bakterien überwogen die Proteobacteria (28%), Planctomycetes (16%), Chloroflexi (14%) und Acidobacteria (13%). Acidobacteria, Chloroflexi, Nitrospirae, Firmicutes und Gemmatimonadetes waren häufiger in verdichteten Böden, während Alphaproteobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia in den ungeschädigten Vergleichsböden überwogen.

Bei den Pilzen dominierten die Ascomycota (48%), Basidiomycota (7%) und Zygomycota (3%). Pilze, deren Verwandtschaftsgrad wir nicht identifizieren konnten, machten ca. 40% aller pilzlichen Sequenzen aus. Basidiomycota und Glomeromycota waren häufiger in den ungeschädigten Vergleichsböden, während Ascomycota und Chytridiomycota häufiger in verdichteten Böden waren.

Alpha-Diversität (Anzahl Arten, Diversitätsindex)

Tabelle 1: Alpha-Diversität (Anzahl OTUs, Shannon Diversität-index und „Coverage“) von Bakterien im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Regeneriert) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung.

Zeitpunkt	Monate nach Start	Behandlung	Anzahl OTUs	Shannon-Diversität Index	Coverage „Amplikon abdeckung“
Mai 14	0	Kontrolle	1418 ± 37	6.43 ± 0.03	88 ± 1
Juli 14	2	Kontrolle	1416 ± 22	6.37 ± 0.05	88 ± 0
August 14	4	Kontrolle	1318 ± 17	6.33 ± 0.02	89 ± 0
Oktober 14	6	Kontrolle	1362 ± 49	6.38 ± 0.05	89 ± 1
Mai 15	12	Kontrolle	1313 ± 45	6.40 ± 0.04	91 ± 1
Mai 14	0	Verdichtet_Regeneriert	1247 ± 24	6.30 ± 0.05	90 ± 0
Juli 14	2	Verdichtet_Regeneriert	1185 ± 32	6.06 ± 0.07	90 ± 1
August 14	4	Verdichtet_Regeneriert	1244 ± 53	6.21 ± 0.08	90 ± 1
Oktober 14	6	Verdichtet_Regeneriert	1265 ± 52	6.28 ± 0.03	90 ± 1
Mai 15	12	Verdichtet_Regeneriert	1226 ± 26	6.29 ± 0.08	92 ± 0

Die Alpha-Diversität (Anzahl OTUs und Shannon-Diversität Index) der Bakterien war zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p > 0.00001$) höher in den ungeschädigten Kontrollböden (Kontrolle) verglichen mit in den verdichteten Böden während der zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung (Tabelle 1). Die Anzahl OTUs (Mass für die Anzahl Arten) war in den ungeschädigten Vergleichsböden zwischen 1313 und 1418, während die Anzahl OTUs in den verdichteten Böden zwischen 1185 und 1265 lagen. Ebenfalls war der Shannon-Diversität Index als Mass für die Diversität in den ungeschädigten Vergleichsböden erhöht verglichen mit den verdichteten Böden (Tabelle 1). Beim Zeitpunkt 0 im Mai 14 (Ausgangszustand; vor den Regenerationsmassnahmen) waren die Anzahl OTUs und der Shannon Diversitäts Index signifikant höher in den Kontrollböden (OTU: 1418 ± 37 ; Shannon: 6.43 ± 0.03) verglichen mit den verdichteten Böden (OTU: 1247 ± 24 ; Shannon: 6.30 ± 0.05). Nach der zwölfmonatigen Regenerationsphase waren die Anzahl OTUs und der Shannon-Diversitäts Index immer noch signifikant höher in den ungeschädigten Vergleichsböden (OTU: 1313 ± 45 ; Shannon 6.40 ± 0.04) verglichen mit den verdichteten Böden (OTU: 1226 ± 26 ; Shannon 6.29 ± 0.08). Wir vermuten, dass sich die zwölfmonatige Regenerationsmassnahmen noch nicht positiv auf die Anzahl der Bakterienarten ausgewirkt hat. Die „Coverage“ (Deckungsgrad der Diversität) lag bei den Bakterien um 90% (schwankend von 88 bis 92%). Die „Coverage“ ist ein Mass für den Anteil der beobachteten OTUs an der abgeschätzten Gesamtzahl an OTUs in einer Probe und dieser Wert schwankt zwischen 0% (sehr tief) und 100% (sehr hoch). Eine hohe „Coverage“ der bakteriellen Sequenzen deutet darauf hin, dass alle in den Böden relevanten Arten erfasst wurden.

Tabelle 2:-Alpha-Diversität (Anzahl OTU, Shannon Diversität-index und „Coverage“) von Pilzen im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Regeneriert) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung.

Zeitpunkt	Monate nach Start	Behandlung	Anzahl OTUs	Shannon-Diversität Index	Coverage „Amplikon abdeckung“
Mai 14	0	Kontrolle	507 ± 26	4.11 ± 0.17	94 ± 0
Juli 14	2	Kontrolle	514 ± 27	4.22 ± 0.40	95 ± 1
August 14	4	Kontrolle	418 ± 63	3.85 ± 0.72	96 ± 1
Oktober 14	6	Kontrolle	456 ± 30	4.23 ± 0.08	96 ± 1
Mai 15	12	Kontrolle	407 ± 64	3.42 ± 1.36	96 ± 0
Mai 14	0	Verdichtet_Regeneriert	239 ± 10	3.23 ± 0.23	96 ± 0
Juli 14	2	Verdichtet_Regeneriert	289 ± 14	3.43 ± 0.13	97 ± 0
August 14	4	Verdichtet_Regeneriert	262 ± 21	2.90 ± 0.26	98 ± 0
Oktober 14	6	Verdichtet_Regeneriert	317 ± 8	3.47 ± 0.44	97 ± 0
Mai 15	12	Verdichtet_Regeneriert	347 ± 32	3.06 ± 0.77	97 ± 1

Die Alpha-Diversität (Anzahl OTUs und Shannon-Diversität Index) der Pilze war zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p > 0.00001$) höher in den ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle) als in den verdichteten Böden während der zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung (Tabelle 2). Die Anzahl OTUs war in den ungeschädigten Vergleichsböden zwischen 407 und 514, während die Anzahl OTUs zwischen 239 und 347 in den verdichteten-regenerierten Böden lagen. Ebenfalls war der Shannon-Diversitäts Index als Mass für die Diversität in den ungeschädigten Vergleichsböden erhöht verglichen mit den verdichteten Böden. Beim Zeitpunkt 0 im Mai 14

(Ausgangszustand; vor den Regenerationsmassnahmen) waren die Anzahl OTUs und der Shannon Diversitätsindex in den verdichteten Böden (OTU: 239 ± 10 ; Shannon: 3.23 ± 0.23) stark reduziert verglichen mit den ungeschädigten Vergleichsböden (OTU: 507 ± 26 ; Shannon: 4.11 ± 0.17). Die Pilzdiversität in den verdichteten Böden erholte sich aber leicht im Verlauf der zwölfmonatigen Regenerationsphase. Die Anzahl OTUs und der Shannon-Diversitäts Index waren zwar immer noch höher in den ungeschädigten Vergleichsböden (OTU: 407 ± 64 ; Shannon: 3.42 ± 1.36) verglichen mit den verdichteten Böden (OTU: 347 ± 32 ; Shannon: 3.06 ± 0.77) aber deutlich weniger stark. Wir vermuten, dass sich die zwölfmonatige Regenerationsphase positiv auf die Anzahl Pilzarten in den verdichteten Böden ausgewirkt haben. Die „Coverage“ (Deckungsgrad der Diversität) war bei den Pilzen höher als den Bakterien und schwankte bei den Pilzen zwischen 94 % und 98%. Tendenziell war die „Coverage“ in den verdichteten Böden leicht höher als in den ungeschädigten Vergleichsböden.

Beta-Diversität (Vergleich der mikrobiellen Lebensgemeinschaften = Ähnlichkeiten zwischen den Gemeinschaften)

Beta-Diversität von Bakterien

Abbildung 6 (linke Graphik) zeigt, dass die bakteriellen Gemeinschaften in den ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle, grüne Symbole) verschieden von den bakteriellen Gemeinschaften in den verdichteten Böden (Verdichtet_Regeneriert, rote Symbole) waren.

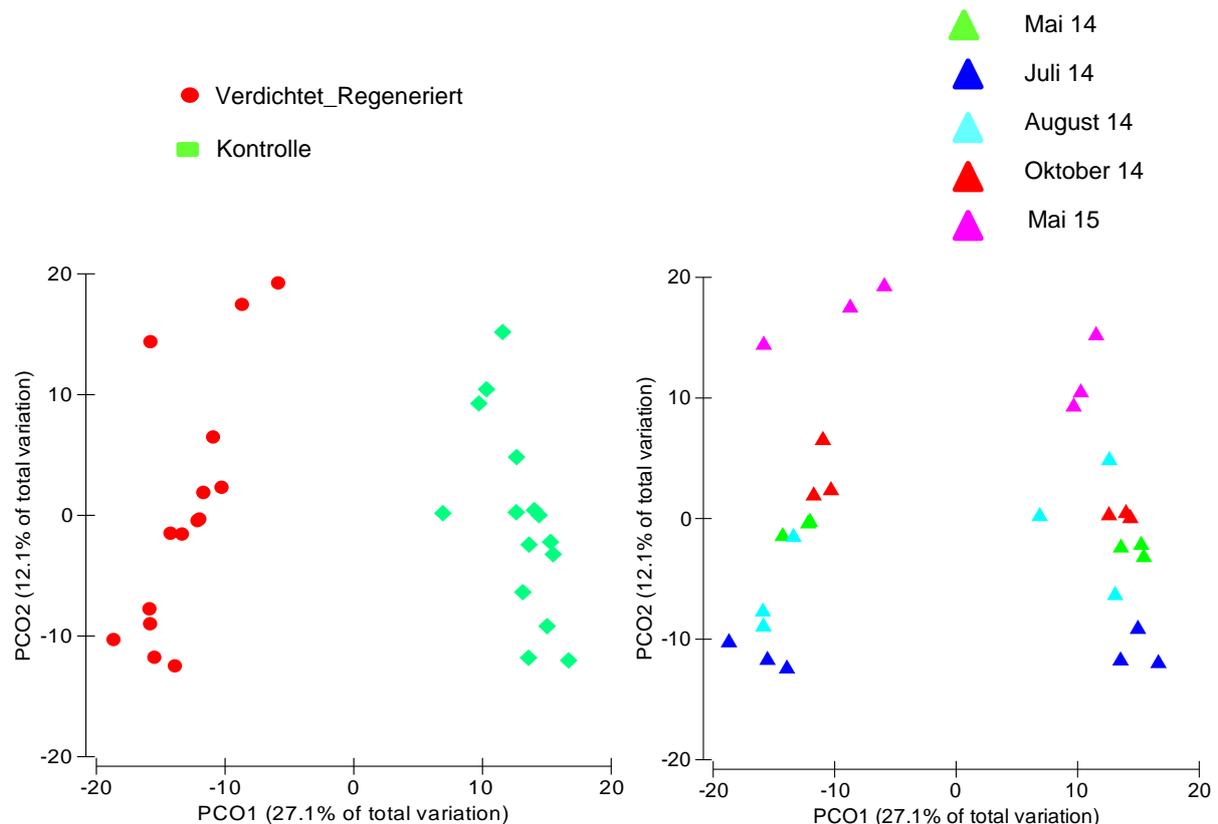


Abbildung 6: Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Regeneriert) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung. Jeder Datenpunkt repräsentiert die bakterielle Gemeinschaft einer Bodenprobe, einander nähere gelegene Datenpunkte haben ähnelnde Gemeinschaften. Verdichtung

fördert unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften (linke Graphik). Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften zeigt in Abhängigkeit von der Verdichtung zwei unterschiedliche Cluster in der Hauptkomponentenanalyse (PCO1, PCO2) auf. Die bakteriellen Gemeinschaften in verdichteten Böden (rote Symbole; linke Graphik) unterscheiden sich deutlich von den Gemeinschaften in den ungeschädigten Vergleichsböden (grüne Symbole; linke Abbildung). Die rechte Graphik zeigt die gleichen Datenpunkte aber im Zeitverlauf. Jeder Zeitpunkt ist durch eine andere Farbe markiert. Durch die Regenerationsmassnahmen haben sich die bakteriellen Gemeinschaften zwischen den verdichteten-regenerierten und den ungeschädigten Vergleichsböden angeglichen (Vergleich der lila Datenpunkte mit den grünen/blauen Datenpunkte). Die zwölfmonatige regenerative Bewirtschaftung führte zu einer Resilienz (Erholung) der bakteriellen Gemeinschaften in den verdichteten Böden (Tabelle 3; paarweise statistische Analyse).

Vor den Regenerationsmassnahmen oder in einer frühen Phase der Regeneration (Zeitpunkte Mai 14, Juli 14 und August 14) waren die bakteriellen Gemeinschaftsstrukturen in den verdichteten-regenerierten Böden am stärksten verschieden von den Gemeinschaftsstrukturen in den Kontrollböden (Abbildung 6b; Vergleich blauer und grüner Symbole). Die statistische Analyse (Tabelle 3) des Vergleiches der bakteriellen Lebensgemeinschaften zwischen den verdichteten-regenerierten Böden und den Kontrollböden zeigte aber, dass sich nach einer zwölfmonatigen Regenerationsmassnahme die bakteriellen Gemeinschaftsstrukturen zwischen den verdichteten-regenerierten und den ungestörten Kontrollböden angeglichen haben. Die Verfahren nach 12 Monaten Regenerationsdauer waren nicht mehr signifikant verschieden ($p = 0.1005$) und zeigten eine positive Wirkung (Tabelle 3). Wir vermuten daher, dass eine Resilienz der bakteriellen Gemeinschaften nach einer zwölfmonatigen Regenerationsphase stattgefunden hat.

Tabelle 3: Statistische Tests (PERMANOVA) der Beta-Diversität (Ähnlichkeiten der Gemeinschaftsstrukturen) von Bakterien im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Regeneriert) und in einem ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung. Die globalen Tests für die Behandlung und die Zeitpunkte zeigen die Signifikanz mittels Monte Carlo (MC) Test. Fettgedruckt zeigen signifikante Unterschiede bei einem P-Wert von 0.05. Die paarweisen Tests vergleichen die Signifikanz (mittels Monte Carlo Test) der Behandlung: verdichtet-regeneriert versus ungeschädigten Vergleichsböden bei allen Zeitpunkten.

Globale Test	P (MC)	Paarweise Tests	P (MC)
Behandlung	0.0001	Mai 14	0.0094
Zeitpunkte	0.0001	Juli 14	0.0114
		August 14	0.0285
		Oktober 14	0.0275
		Mai 15	0.1005

Beta-Diversität von Pilzen

Abbildung 7 (linke Graphik) zeigt, dass die pilzlichen Gemeinschaften in den ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle, grüne Symbole) verschieden von den pilzlichen Gemeinschaften in den verdichteten Böden (Verdichtet_Regeneriert, rote Symbole) waren. Vor den Regenerationsmassnahmen oder in einer frühen Phase der Regeneration (Zeitpunkte Mai 14, Juli 14 und August 14) waren die pilzlichen Gemeinschaften in den verdichteten Böden am stärksten von den pilzlichen Gemeinschaften in den ungeschädigten Vergleichsböden verschieden (rechte Graphik; Vergleich blauer und grüner Symbole). Die statistische Analyse (Tabelle 4) des

Vergleiches der pilzlichen Gemeinschaften zwischen den verdichteten-regenerierten Böden und den ungeschädigten Vergleichsböden zeigte aber, dass sich nach einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung der verdichteten Böden die pilzlichen Gemeinschaften zwischen den verdichteten-regenerierten und den ungeschädigten Vergleichsböden angeglichen haben. Die Behandlungen waren nur knapp nicht mehr signifikant verschieden ($p = 0.0573$), das heisst die Regeneration der pilzlichen Populationen scheint langsamer zu verlaufen als jene der Bakterien ($p = 0.1005$).

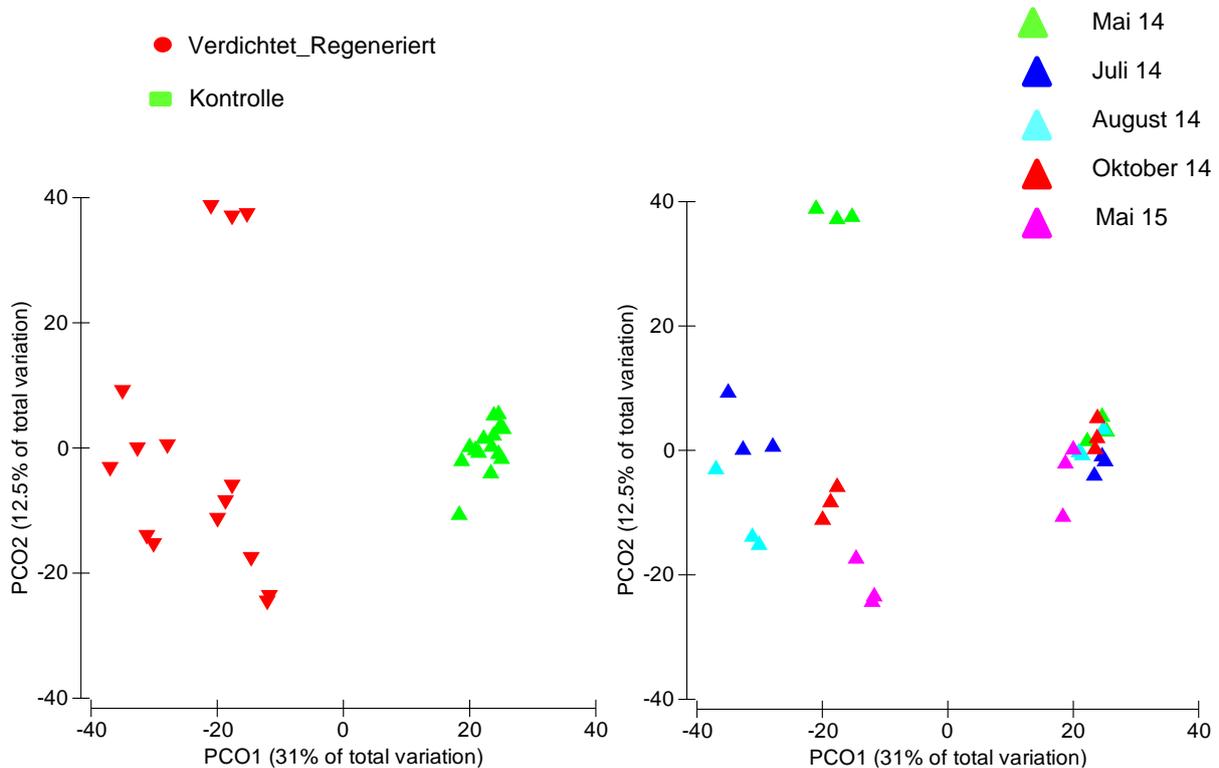


Abbildung 7: Vergleich der pilzlichen Gemeinschaften im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Regeneriert) und in einem ungeschädigten Vergleichsboden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung. Jeder Datenpunkt repräsentiert die pilzliche Gemeinschaften einer Bodenprobe, einander nähere gelegene Datenpunkte haben ähnliche Gemeinschaften. Verdichtung fördert unterschiedliche pilzliche Gemeinschaften (linke Graphik). Die Zusammensetzung der pilzlichen Gemeinschaftsstrukturen zeigt in Abhängigkeit von der Verdichtung zwei unterschiedliche Cluster in der Hauptkomponentenanalyse (PCO1, PCO2) auf. Die pilzlichen Gemeinschaften in verdichteten Böden (rote Symbole; linke Graphik) unterscheiden sich deutlich von den Gemeinschaften in den ungeschädigten Vergleichsböden (grüne Symbole; linke Abbildung). Die rechte Graphik zeigt die gleichen Datenpunkte im Zeitverlauf. Jeder Zeitpunkt ist durch eine andere Farbe markiert. Die pilzlichen Gemeinschaften in den ungeschädigten Vergleichsböden sind über die Zeit stabil, deren Datenpunkte liegen nahe beieinander (Cluster auf der rechten Seite). Die pilzlichen Gemeinschaften in den verdichteten Böden variieren stärker im Zeitverlauf (Datenpunkte auf der linken Seite). Durch die Regenerationsmassnahmen haben sich die pilzlichen Gemeinschaften zwischen den verdichteten-regenerierten und den ungeschädigten Vergleichsböden angeglichen (Vergleich der lila Datenpunkte mit den grünen/blauen Datenpunkte). Die zwölfmonatige regenerative

Bewirtschaftung führte zu einer Resilienz (Erholung) der pilzlichen Gemeinschaften in den verdichteten Böden (Tabelle 4; paarweise statistische Analyse).

Tabelle 4: Statistische Tests (PERMANOVA) der Beta-Diversität (Ähnlichkeiten der Gemeinschaftsstrukturen) von Bakterien im Oberboden (0-20 cm) des freigelegten geschädigten Bodens (Verdichtet_Regeneriert) und in einem ungeschädigten Vergleichsböden (Kontrolle) während einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung. Die globalen Tests für die Behandlung und die Zeitpunkte zeigen die Signifikanz mittels Monte Carlo (MC) Test. Fettgedruckt zeigen signifikante Unterschiede bei einem P-Wert von 0.05. Die paarweisen Tests vergleichen die Signifikanz (mittels Monte Carlo Test) der Behandlung: verdichtet-regeneriert versus ungeschädigten Vergleichsböden bei allen Zeitpunkten.

		Paarweise Tests	P (MC)
		Mai 14	0.0085
		Juli 14	0.0058
		August 14	0.0121
		Oktober 14	0.0096
		Mai 15	0.0573
Globale Tests	P (MC)		
Behandlung	0.0001		
Zeitpunkte	0.0001		

Indikatorenspesies-Analyse

Mit den Indikatorenspesies-Analysen untersuchten wir Arten, die Bodenstrukturschäden nach Verdichtung anzeigen. Diese Arten sind daher mikrobielle Zeiger (Indikatoren) für Strukturschäden. Anhand von diesen Indikatorenarten können wir abschätzen, ob die Böden weiterhin stark verdichtet sind oder ob sich nach der regenerativen Bewirtschaftung der verdichteten Böden bereits spürbare Verbesserungen der Bodeneigenschaften bemerkbar machen.

Verschiedene Indikatoren-OTUs (Arten) für Strukturschäden (Verdichtung) konnten in dieser Studie identifiziert werden. Diese Indikatoren-OTUs sind in Abbildung 8 rot dargestellt. Diese Arten korrelieren stark mit Verdichtung und kommen daher vorwiegend nur in verdichteten Böden vor. Einige Beispiele dieser Arten und ihr taxonomischer Verwandtschaftsgrad sind in Abbildung 9 dargestellt. OTUs aus den Abteilungen (Phylum) der Acidobacteria, Chloroflexi (OTUs: Anaerolineaceae), Firmicutes (OTU: Clostridien), Proteobacteria (OTU: Myxococcales und Anaeromycobacter aus der Klasse der Deltaproteobacteria) sind mehrheitlich mit verdichteten Böden assoziiert (**rot markierte Punkte**), wogegen Proteobacteria (v.a. Alphaproteobacteria; OTU: Rhizobiales; Rhodospirilliales; Rhodoplanes), Planctomycetes (OTU: Phycisphaeraceae), Verrucomicrobia (OTU: Spartobacteria; Pedosphaerales) in den ungeschädigten Vergleichsböden (**grün markierte Punkte**) dominierten. Die ersteren OTUs (rot markierten Punkte) sind bekannt dafür, dass sie unter sauerstofflimitierenden (anaeroben) Bodenbedingungen häufig vorkommen. Dagegen sind die letzteren OTUs (grün markierten Punkte) wie Stickstofffixierer (Rhizobien und Bradyrhizobium), die in Symbiose mit Luzerne leben bekannt dafür, dass sie in gut durchlüfteten Böden dominieren. Leguminosen hatten Oberhand in den regenerativ bewirtschafteten Flächen.

Bei den Pilzen konnten wir keine eindeutigen Indikatoren für Strukturschäden finden. Einzig einige Arten wie *Rhodotorula* (Hefen aus dem Phyla Basidiomycota), *Mortierella* (Zygomycota) und einige Taxa aus dem Phyla Ascomycota waren mehrheitlich mit verdichteten Böden assoziiert. Dagegen kamen in verdichteten Böden mit im Verlauf der Regenerationsphase und mit dem Anbau von Luzerne arbuskuläre Mykorrhizen aus der Familie Glomeraceae auf.

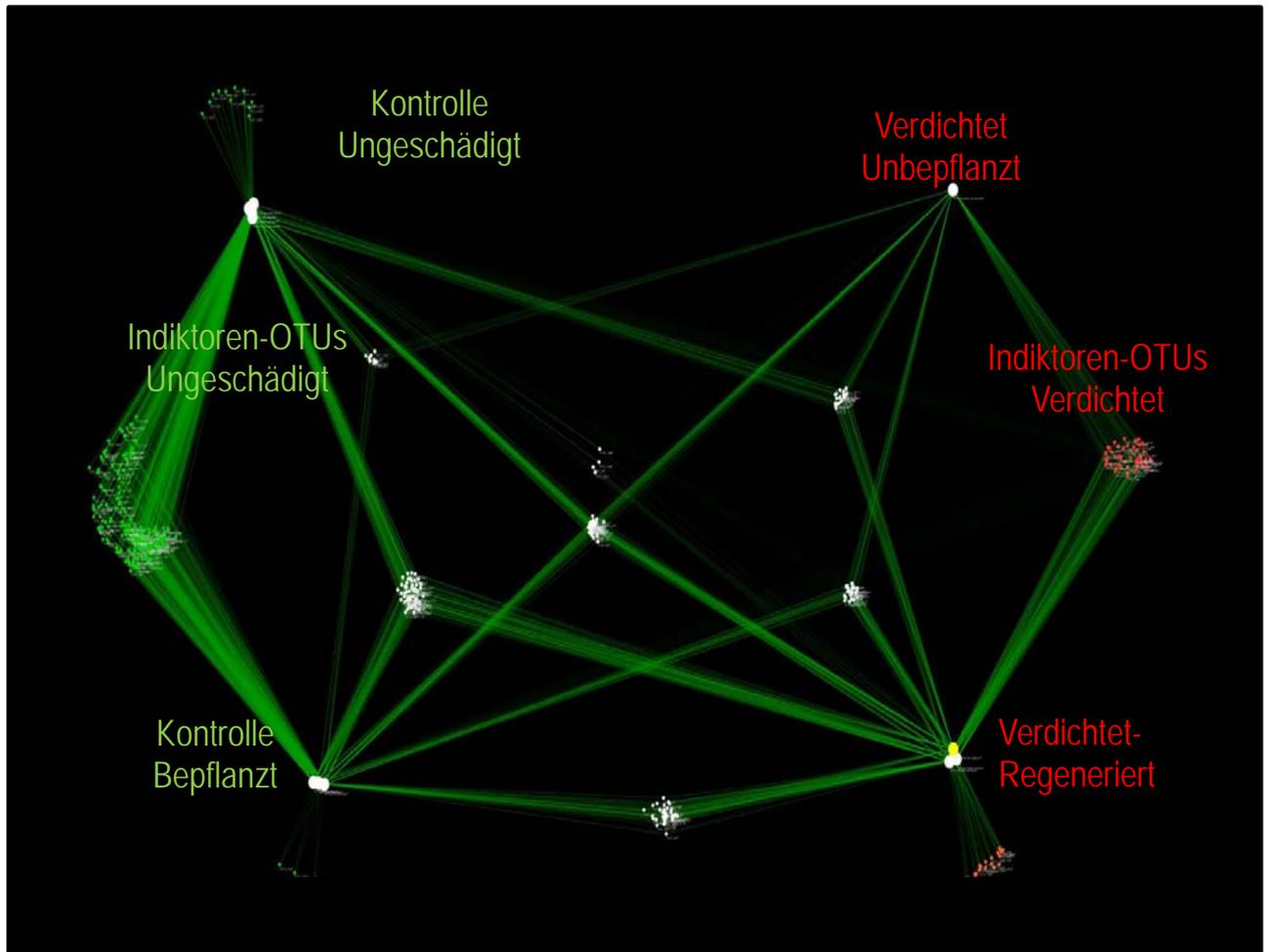


Abbildung 8: Das Bipartite Netzwerk zeigt, welche OTUs (Arten) in welchen Böden vorkommen. Rot markierte Populationen (mehrheitlich anaerobe Bakterien wie Anaerolineaceae) werden durch die Verdichtung gefördert. Sie kommen nur in den verdichteten und regenerierten Böden vor. Grün markierte Populationen (mehrheitlich Stickstofffixierer wie Rhizobien) kommen nur in den ungeschädigten Vergleichsböden vor. Sie sind daher Indikatorenarten für ungestörte Böden. Diese Populationen sind durch die Verdichtung unter Aufschüttung negativ beeinträchtigt worden. Weiss markierte Populationen können nicht eindeutig einer Behandlung zugeordnet werden und gelten daher nicht als Indikatorenarten. Bemerkung: Es sind nur die OTUs mit den höchsten Korrelationen zu der regenerativen Bewirtschaftung dargestellt.

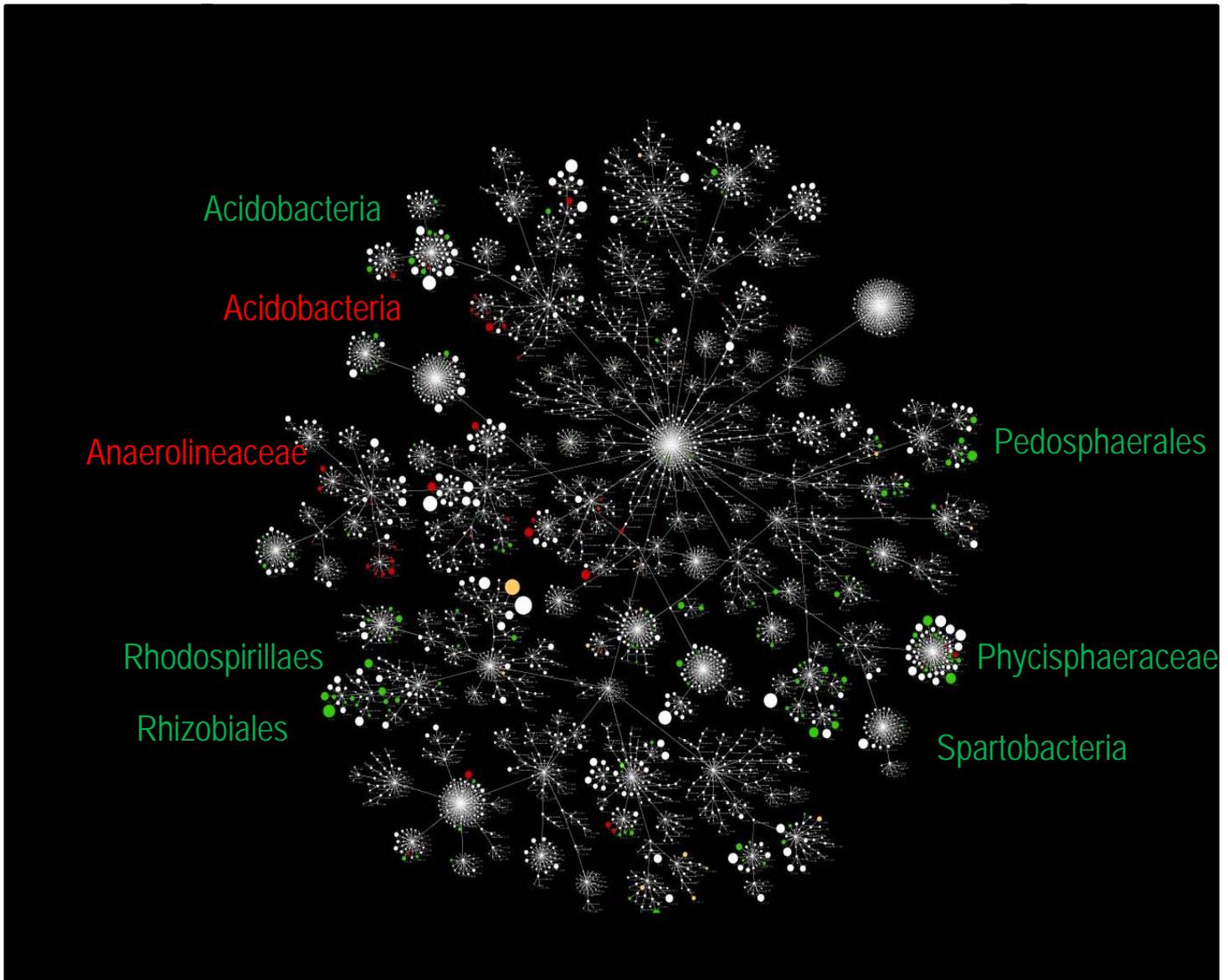


Abbildung 9: Bakterien als Indikatoren für Strukturschäden in Böden. Taxonomisches Netzwerk der bakteriellen Gemeinschaften (von der Domäne bis zu den einzelnen Arten) und der Verdichtungseinfluss auf die Populationen. Die Grösse der Knotenpunkte repräsentiert die relative Abundanz der jeweiligen Gruppe in der ganzen Gemeinschaft. Weiss markierte Populationen sind unbeeinflusst und rot markierte Populationen (Indikatorenarten für Strukturschäden) sind sensitiv gegenüber Bodenverdichtung. Grüne Populationen (mehrheitlich Stickstofffixierer wie Rhizobien) sind signifikant stärker abundant in den ungeschädigten Vergleichböden (Indikatorenarten für ungestörte Böden). Diese Populationen wurden durch die Verdichtung negativ beeinflusst. Rot markierte Populationen (mehrheitlich anaerobe Bakterien wie Anaerolineaceae) sind durch die Verdichtung nach Aufschüttung gefördert worden, sind aber zum Teil im Verlauf der zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung zurückgegangen oder ganz verschwunden.

Schlussfolgerungen

Die Bodenbedingungen haben sich durch die Regenerationsmassnahmen und die Ansaat einer Wiesenmischung im Verlaufe eines Jahres signifikant verbessert. Die Strukturschäden der Bodenverdichtung sind aber teilweise noch sichtbar. Die Wurzeln der Luzerne haben den verdichteten Boden stark durchwurzelt. Wahrscheinlich hat sich durch diese Regenerationsmassnahmen auch die Durchlüftung des Bodens stark verbessert. Die von Agroscope nach einem Jahr regenerativer Bewirtschaftung durchgeführten Spatenproben (Abbildung 10) zeigten eine sehr positive Entwicklung in der intensiv bearbeiteten oberen Oberbodenschicht. Hier hat sich der Gefügestand aus dem Zusammenspiel zwischen mechanischer Lockerung durch die Bodenbearbeitung und biologischer Gefügebildung durch die Pflanzenwurzeln sehr stark verbessert, die extremen Verdichtungen konnten beseitigt werden.



Abbildung 10: Spatenprobe zur Beurteilung des Zustandes des verdichteten, ehemals überschütteten Bodens kurz nach dessen Freilegung (links) und nach einer zwölfmonatigen regenerativen Bewirtschaftung (Fotos Urs Zihlmann / Peter Weisskopf, Agroscope).

Das erhöhte Auftreten von Methan-produzierenden Populationen in den verdichteten Böden, deutet aber darauf hin, dass der strukturelle Bodenzustand nach einer einjährigen Regenerationsphase noch nicht das Ausgangsniveau erreicht hat (Weisskopf et al. 2014). Das Auftreten von Methan-produzierenden Populationen im Boden ist ein guter Indikator für lebensfeindliche Bedingungen (eingeschränkter Gasaustausch, Sauerstoffmangel -- Schaden) im Boden (Frey 2011; Frey et al. 2011; Frey und Hartmann 2013). Generell fand aber eine starke Abnahme der Methan-produzierenden Arten in verdichteten Böden gegenüber dem Ausgangszustand im Mai 2014 (Start) statt. Wir vermuten daher, dass das Bodenmilieu für die Methan-produzierenden Populationen durch die zwölfmonatige regenerative Bewirtschaftung verschlechtert wurde respektive, dass eine verbesserte Bodenstruktur zu einem günstigeren Bodenmilieu für aerobe Lebensprozesse führte.

Die mikrobielle Biomasse (gemessen an der Menge extrahierter DNA) hat sich mit der Bodenbearbeitung und Ansaat einer Wiesenmischung in den verdichteten und regenerierten Böden erholt. Die Werte sind aber nach der zwölfmonatigen Regenerationsphase immer noch tiefer als in den ungeschädigten Vergleichsböden. Die Anzahl der Bakterien ist durch die Verdichtung kaum beeinflusst worden. Die Pilze reagieren empfindlicher auf die Verdichtung als die Bakterien. Die Abundanz der Pilze in den verdichteten-regenerierten (Verdichtet_Reg) Böden erhöhte sich im Verlauf der Regenerationsphase und war nach einem Regenerationsjahr gleich wie in den ungeschädigten Vergleichsböden. Wir folgern hiermit, dass sich die Pilze durch die Bodenbearbeitung und Entwicklung von Wurzeln nach einem Jahr deutlich, wenn auch noch nicht vollständig erholt haben. Das bedeutet, dass die Bodeneigenschaften günstiger (z.B. bessere Durchlüftung und dadurch gute Sauerstoffverfügbarkeit durch günstigere Bodenstruktur) für sauerstoffliebende Organismen wie Mykorrhizapilze und Wurzeln geworden sind. Vor allem die molekulargenetischen Analysen zeigten, dass die Stickstofffixierer (Rhizobien) und die arbuskulären Mykorrhizen durch den Anbau von Luzerne gefördert wurden.

Die Artenanzahl und Diversität der Bakterien wie auch der Pilze waren durch die Verdichtung stark beeinflusst worden und haben sich durch die zwölfmonatigen Regenerationmassnahmen leicht aber noch nicht vollständig erholt. Durch die Regenerationmassnahmen haben sich die bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften zwischen den verdichteten-regenerierten und den ungeschädigten Vergleichsböden angeglichen. Wir folgern, dass die zwölfmonatige regenerative Bewirtschaftung zu einer teilweisen Resilienz der bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften geführt haben. Wir vermuten, dass ein weiteres Jahr lang Regenerationmassnahmen nötig gewesen wären, bis sich eine vollständige Erholung der bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften gezeigt hätte.

Literatur

- Frey B. (2010) Bewertung von Bodenveränderungen durch Befahrung in Waldböden mittels bakteriellen Populationen. Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen 161: 498 – 503.
- Frey B. (2015) Schutz der Boden-Biodiversität – Auswirkungen des Einsatzes von Holzerntemaschinen auf das Bodenmikrobiom. Bodenschutz im Wald. Forum Boden – Gewässer - Altlasten. Osnabrück 30. Oktober 2015.
- Frey B., Hartmann M. (2013). Biodiversität von Waldböden – Auswirkungen des Einsatzes von Holzerntemaschinen auf mikrobielle Gemeinschaften. Forum für Wissen, WSL Birmensdorf, 61 – 69.
- Frey B., Niklaus P.A., Kremer J., Lüscher P. Zimmermann S. (2011) Heavy-machinery traffic impacts methane emissions as well as methanogen abundance and community structure in oxic forest soils. Applied and Environmental Microbiology 77: 6060 - 6068.
- Hartmann M, Niklaus PA, Zimmermann S, Schmutz S, Kremer J, Abarenkov K, Lüscher P., Widmer F., Frey B. (2014) Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. The ISME Journal 8: 226 – 244.
- Weisskopf P., Zihlmann U., Oberholzer H-R, Frey B. (2014) Fallstudie „Regeneration Golfplatz Otelfingen“: Ergebnisse der ersten Regenerationsphase. Dezember 2014.