

Endbericht 2023

Langzeitmonitoring von Ökosystemprozessen im Nationalpark Hohe Tauern 2021 - 2022

Modul 04: Bodenmikrobiologie

 **Bundesministerium**
Klimaschutz, Umwelt,
Energie, Mobilität,
Innovation und Technologie

Im Auftrag von:

Sekretariat des Nationalparkrates Hohe Tauern

Kirchplatz 2

A-9971 Matrei i.O. Austria

Durchführung der Arbeiten:

Prof. Mag. Dr. Martin Grube
Institut für Pflanzenwissenschaften
Universität Graz
Holteigasse 6
8010 Graz

EINLEITUNG

Als eines der größten alpinen Schutzgebiete hat der Nationalpark Hohe Tauern ein interdisziplinäres, integratives Monitoring- und Forschungsprogramm zur langfristigen Ökosystembeobachtung entwickelt und etabliert. Es dient der systematischen Beobachtung und Dokumentation der Entwicklung naturbelassener terrestrischer und aquatischer Ökosysteme über einen längeren Zeitraum, samt ihrer chemisch-physikalischen und biologischen Eigenschaften. Dabei werden Schlüsselparameter, wie z. B. das Mikroklima, die Physik und Chemie der Böden, das Boden-Mikrobiom, die Artendiversität und Produktivität regelmäßig und standardisiert erfasst. Unter dem Leitthema „Leben an Existenzgrenzen im Hochgebirge“ wurden dafür die Nationalparktäler Seebachtal (Kärnten), Ober- und Untersulzbachtal (Salzburg) und Innerschlöss (Tirol) ausgewählt, um diesen neuen Forschungsschwerpunkt in den Hohen Tauern aufzubauen (Körner 2018).

Ziel dieses vorliegenden Projektes war es in den Jahren 2021 und 2022 dieses interdisziplinäre, integrative Monitoring- und Forschungsprogramm fortzuführen. Es wurde in den relevanten Disziplinen im Rahmen von „Modulen“ (Teil-Projekten) abgewickelt. Sie beruhen auf die Arbeiten des vorangegangenen Pilotprojektes, die in einem Synthesebericht zusammengefasst publiziert wurden (Körner et al. 2020). Das Ziel des Moduls 04 (Bodenmikrobiologie) war eine Erhebung der mikrobiellen Vielfalt der Monitoring-flächen, so wie sie in der Startphase der Pilotprojektes methodisch etabliert wurden (Fernandez Mendoza & Grube 2019a,b).

Unter mikrobieller Vielfalt verstehen wir in unserem Projekt vorwiegend die Bakterien (und teilweise miterfassten Archaeen, die manchmal auch als Urbakterien bekannt sind) und die Pilze (sowohl solche die große Fruchtkörper bilden, als auch jene die mikroskopisch den Boden durchsetzen). Die Diversität dieser Mikroorganismen wurde dabei mittels der Sequenzierung und Analyse der DNA festgestellt. Damit können die Gesamtvielfalt und die verwandtschaftliche Zugehörigkeit der im Boden anzutreffenden Mikroorganismen ermittelt werden. Dies ist mit früher verwendeten Methoden der Kultivierung nicht möglich gewesen, weil diese nur einen verschwindenden Bruchteil der Biodiversität erfasst und Zuordnungen nicht immer genau sind. Außerdem ist die überwiegende Mehrzahl der Mikroorganismen im Boden mit anderen lebenden Organismen vergesellschaftet ist und daher nicht unter sterilen Bedingungen kultivierbar. Da von Umweltveränderungen sensible biotische Wechselwirkungen vorrangig betroffen sind, ist es aber umso wichtiger, auch diese symbiotischen lebenden Mikroorganismen zu erfassen.

Die Forschungsgruppe Tappeiner & Newesely der Universität Innsbruck etablierte auf den 14 terrestrischen Dauerbeobachtungsflächen (DF) (3 im Seebachtal, 6 im Untersulzbachtal, 5 im Innergschlöss) in Form von Transekten entlang von Schneeschmelzgradienten (vgl. Abb. 2) das Monitoring für die Schlüsselparameter Standortklima, Bodenphysik, Bodenchemie und Produktivität (Modul 01) in enger Kooperation mit Prof. Körner (Basel). Ein derartiger Transekt umfasst idealerweise drei aneinandergrenzende Streifen von etwa 10 m Länge und 1 m Breite, die Gradienten von pessimalen (Schneetälchen) bis zu optimalen Lebensbedingungen (voll entwickelter alpiner Rasen) darstellen (Abb. 1). Der mittlere Streifen bleibt ungestört, die links und rechts angrenzenden Streifen dienen der invasiven Beprobung (Bodenmikrobiologie).

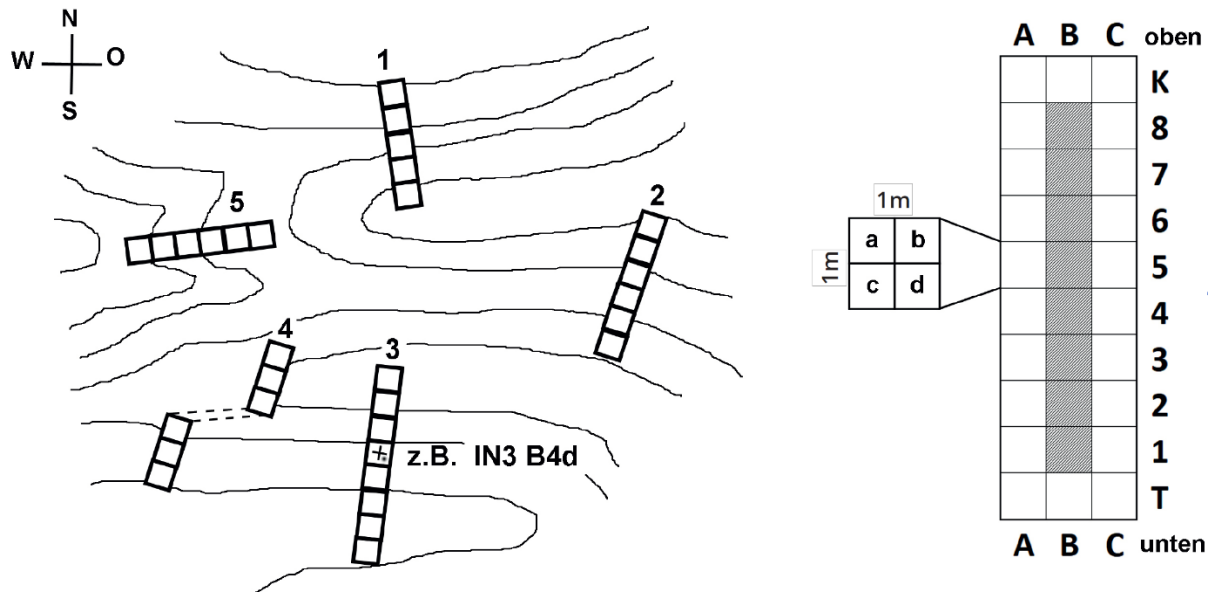


Abbildung 1: Hierarchische Feingliederung der Dauerbeobachtungsflächen (DFs). Die drei zusätzlichen Felder unten am tiefsten Punkt unten tragen die Signatur T (z. B. AT), jene am höchsten Punkt die Signatur K (z. B. AK). (aus Körner et al. 2020)

ZIELSETZUNG

Eine Herausforderung jeden Langzeitmonitorings in Natursystemen ist deren „normale“ zeitliche Variabilität, die oft wenig bekannt ist (Körner et al. 2022). Kann die saisonale Variabilität durch phänologische Fixpunkte (z. B. Blühphänologie von Pflanzen) berücksichtigt werden, so bleibt die Variabilität von Jahr zu Jahr ein komplexes Thema, weil sie von vielen zusätzlichen Faktoren abhängen kann. Diese sind vor allem für mikrobiologische Bodenuntersuchungen noch wenig bekannt. In großem zeitlichem Abstand (mehrere Jahre oder Jahrzehnte) durchgeführte Datenerfassungen können im schlimmsten Fall zufällig ein Minimum oder ein Maximum der natürlichen Amplitude erfassen und somit zu einer massiven Überschätzung oder Unterschätzung des tatsächlichen Trends führen. Es muss also diese Variabilität gut durch wiederholte Untersuchungen erfasst werden, um eine Fehlinterpretation langzeitlicher Entwicklungen zu vermeiden (aus Körner et al. 2020). In unserem Modul stellen wir daher mit einer routinemäßigen Umsetzung des Langzeit-Monitorings auf den ausgewählten terrestrischen Dauerbeobachtungsflächen (DF) im NPHT im Modul 04 (Mikrobiologie) fest, ob sich bisher gefundene Unterschiede der mikrobiellen Vielfalt bestätigen, bzw. wieviel Variabilität zwischen den Erhebungen zu beobachten ist.

Dazu erfolgten in den 14 terrestrischen DF im NPHT eine Beprobung der Böden, um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften (d.h. der Bakterien und Pilze) entsprechend der im Methodenhandbuch vorgegebenen Protokolle zu untersuchen (Fernández Mendoza & Grube 2019a).

METHODIK / MASSNAHMEN

BEPROBUNG

An den mit der Arbeitsgruppe der Universität Innsbruck und EURAC akkordierten Entnahmepunkten wurde nach deren Erfassung der Biomasseproduktion und faunistischen Beprobung eine mikrobiologische Beprobung durchgeführt. Die Beprobung erfolgte nach der Beprobung der Biomasse (Modul 01, Tappeiner & Newesely), an den von diesem Modul ausgewählten und untersuchten Punkten, bzw. an den dort durchgeführten Bodenanstichen der Bodenmesofauna-Untersuchung (Modul 03). An den Seitenwänden der Bodenanstiche wurden aus einer Tiefe von etwa 3 cm unter der Erdoberfläche etwa 1,5 ml Erde steril mit einem Spatel entnommen. Im Anschluss daran wurden die Stellen wieder komplett verschlossen, sodass oberflächlich keine Spuren sichtbar sind. Die Bodenproben wurden in 1.5ml Eppendorf Röhrchen eingefüllt und danach sogleich tiefgekühlt. Zu diesem Zweck wurde ein Transport Container (Voyageur 5, AirLiquide) verwendet, der eine Matrix enthält. Diese wurde vor dem Aufstieg zu den Untersuchungsflächen mit flüssigem Stickstoff gekühlt (die Kälte hält sich in diesem Gefäß für mehr als eine Woche). Der Kühlbehälter wurde dann zu den Standorten mit hinaufgetragen, und dort mit den Proben befüllt. Somit konnten die Proben verlässlich in gekühltem Zustand ins Tal und ins Labor gebracht und bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden. Damit wurde eine nachträgliche Veränderung der Bakterien- und Pilzzusammensetzung vermieden.

BEARBEITUNG IM LABOR

Zur Extraktion wurden die einzelnen Proben zuerst mit einem TissueLyser II (Retsch, Qiagen Wien) gemahlen, bevor eine DNA-Extraktion mittels DNeasy PowerSoil Pro DNA Extraction Kit (Qiagen, Wien) erfolgt. Die extrahierte DNA der Bodenproben wurde tiefgekühlt und ist damit dauerhaft lagerfähig bis zur Weiterverarbeitung. Nach der Extraktion wurden Gene der ribosomalen RNA mit für Bakterien und Pilzen spezifischen DNA-Sonden (Primern) und der PCR-Reaktion vervielfältigt, um ausreichende Konzentrationen dieser Sequenzabschnitte für eine Sequenzierung zu erhalten. Der extern durchgeführte Sequenzierungsprozess lieferte

danach umfangreiche Rohsequenzdaten, die von uns dann gemäß dem Methodenhandbuch (Fernandez Mendoza & Grube 2019a) weiterverarbeitet wurden.

BIOINFORMATISCHE ANALYSE

Die bioinformatische Analyse erfolgte mit einer eigens für das Projekt entwickelten Vorgangsweise (Pipeline), wie im Methodenhandbuch beschrieben (Fernandez Mendoza & Grube 2019a). Dabei wurden die Sequenzen standardisiert in mehreren Schritten bereinigt, entsprechend ihrer Qualität ausgefiltert und die Daten des gesamten Datensatzes Einheiten zugeordnet, die mikrobiellen Arten entsprechen. Danach wurden die relativen Häufigkeiten der gefundenen Bakterien- und Pilzarten in den Proben festgestellt und diese Häufigkeiten in den Proben innerhalb der Gradienten, zwischen den Gradienten, zwischen den Untersuchungsstandorten, sowie zwischen den Beprobungszeiträumen verglichen (Abb. 3-8). Dies ermöglichte weiterreichende Aussagen zur Variabilität der Bodenmikrobienzusammensetzung.



Abbildung 2: Impressionen von den Beprobungen 2022. Links: Seebachtal, Mitte: Innerschloß, Rechts: Untersulzbachtal.

ERGEBNIS/OUTPUT

Die Beprobungen von 2021 standen bedauerlicherweise unter keinem guten Stern, da uns das Wetter den Aktivitäten an mehreren Stellen einen Strich durch die Rechnung gemacht haben. So konnte die Beprobung im Untersulzbachtal aus Witterungsgründen trotz mehrfacher Termine überhaupt nicht durchgeführt werden. Die Probung vom Seebachtal sind schließlich einem massiven Stromausfall in Graz zum Opfer gefallen, der auch die

Kühlanlagen unseres Institutes betroffen hat und die Proben vor der DNA-Extraktion aufgetaut hat. Die Proben stellten sich nach der Sequenzierung als unbrauchbar heraus. Nur die Proben aus dem Innergschlöss waren nutzbar. Da aber dieser einzelne Standort für einen Vergleich nicht ausreicht, setzten wir unsere Bemühungen 2022 fort. In diesem Jahr könnten alle Untersuchungsflächen an den Standorten Seebachtal (Kärnten), Innergschlöss (Osttirol), Untersulzbachtal (Salzburg) vollständig beprobt werden und erlaubten einen Vergleich mit der ersten Beprobung von 2017.

PILZE

Aus den Analysen der Pilze geht hervor, dass der alpine Boden von einer großen Zahl an Gattungen der Basidiomyceten durchzogen ist, die man aus Mykorrhiza-Symbiosen kennt, daneben kommen aber auch Pilze vor, die als saprotrophe Zersetzer bekannt sind (Abb. 3). Die wichtigsten Gattungen die hier gefunden worden sind, sind in guter Übereinstimmung mit oberirdischen Beobachtungen der Basidiomyceten-Diversität. Insgesamt sind Ascomyceten (d.h. die meisten Kleinpilze) und Basidiomyceten (meist typische Hutpilze bzw. „Schwammerl“) gleichermaßen häufig vertreten (Abb. 4).

Ein Vergleich der Beprobungen zwischen 2017 und 2022 zeigt – anhand unterschiedlicher Diversitätsindices – tendentiell eine Zunahme der Pilzdiversität (Abb. 5). Diese Beobachtungen sollen aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass es eine erhebliche Variation in den Datensätzen gibt, aus welcher allgemeine Trends noch schwer ablesbar sind. So konnten 295 Pilze (bzw. OTUs) ausschließlich 2017 nachgewiesen werden, während 584 Pilze nur 2022 gefunden wurden (1787 Pilze wurden zu beiden Zeitpunkten gefunden).

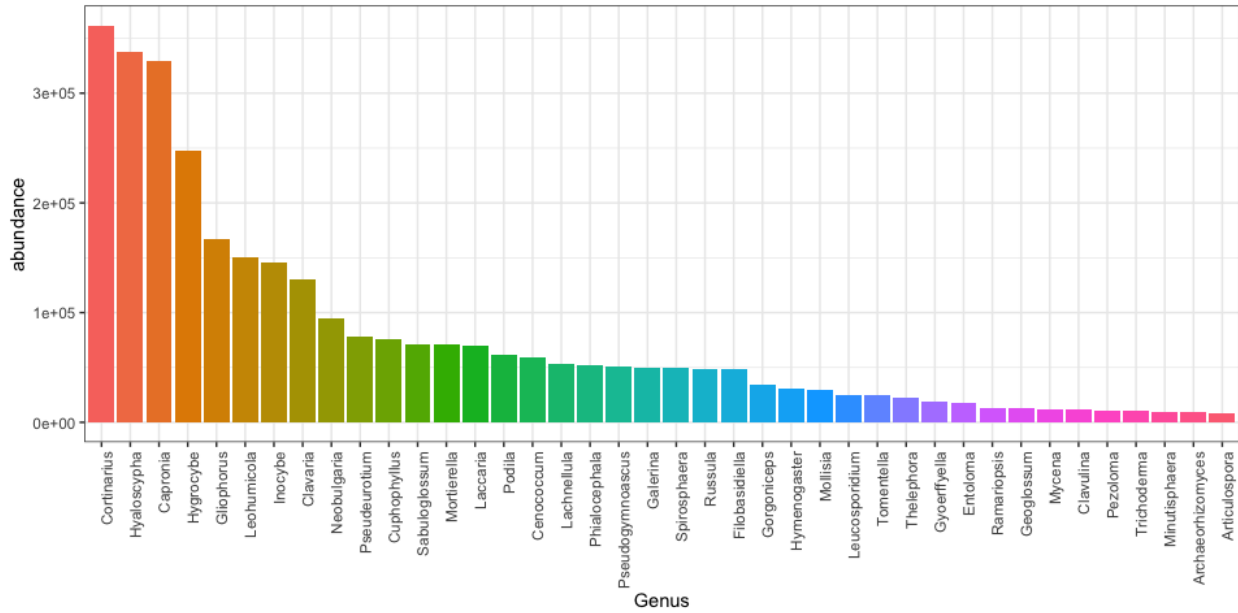


Abbildung 3: Relative Häufigkeiten der gefundenen Pilzgattungen in der Beprobung 2022.

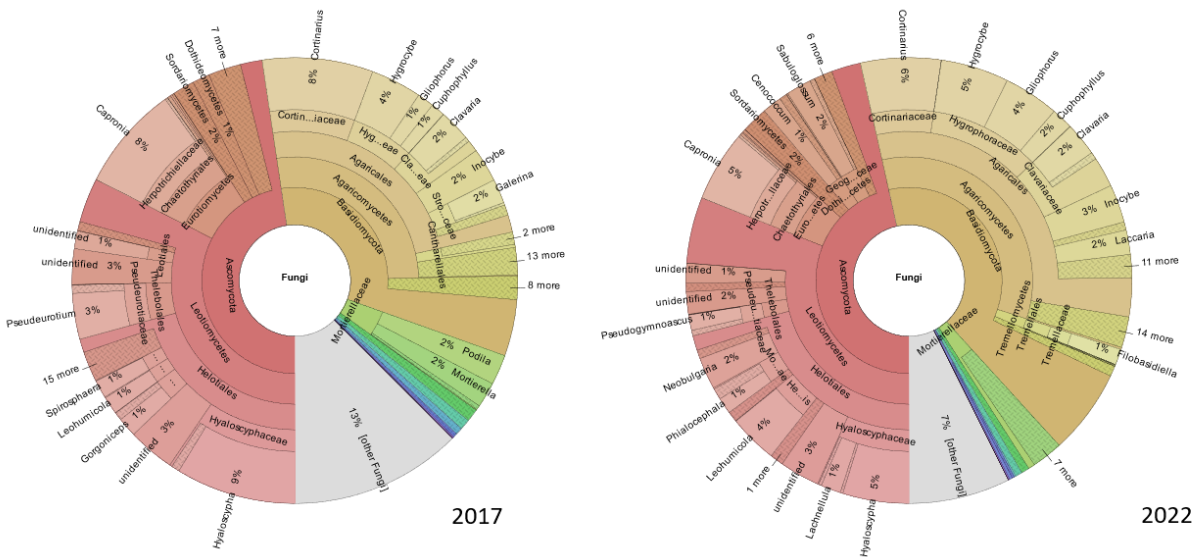


Abbildung 4: Hierarchische Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften im Vergleich von 2017 und 2022

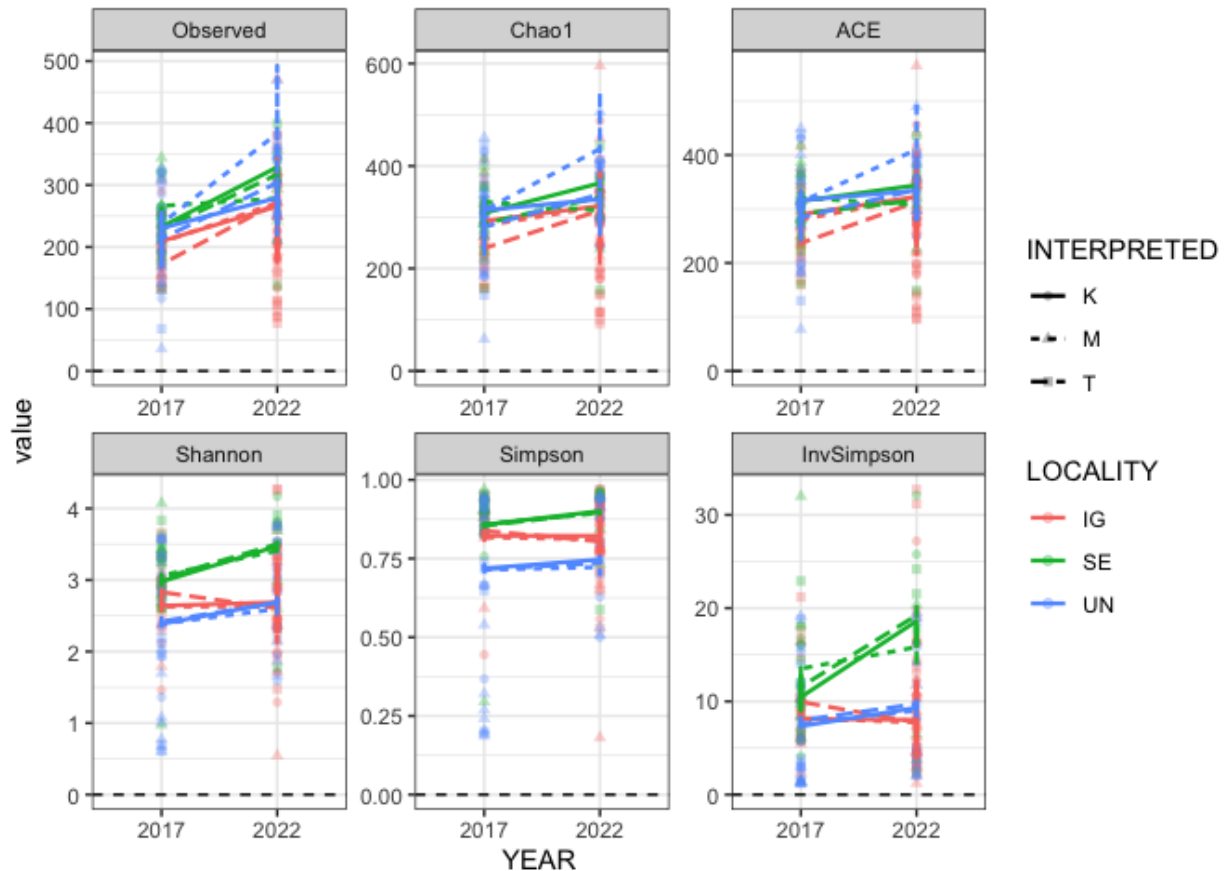


Abbildung 5: Diversitätsindices der Pilze im Vergleich von 2017 und 2022. Bezeichnungen der Gradientenanteile: K..Kopf, M..Mitte, T..Tief. Standorte: IG..Innerschlöß, SE..Seebachtal, UN..Untersulzbachtal.

BAKTERIEN

Die Bakterien sind an den Standorten mit entsprechend höherer Artenzahl vertreten. Daher sind in dieser Darstellung aus praktischen Gründen nur die Familien der Bakterien genannt. Abbildung. 6 zeigt die relativen Häufigkeiten der Familien über die Standorte hinweg dar. Auffällig war dabei, dass eine hohe Anzahl nicht weiter zuordenbarer Bakterien in den Böden vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass alpine Böden nach wie vor eine große Anzahl von Bakteriengruppen enthalten, die noch nicht näher charakterisiert sind. Sie sind daher eine noch nicht geöffnete Schatzkammer bakterieller Diversität. Die hierarchische Analyse dieser Diversität zeigt, dass 5 Bakteriengroßgruppen (Phyla) zu einem mehr oder weniger gleich hohem Anteil vertreten sind: Acidobacteriota, Actinobacteriota, Chloroflexi, Planctomycetota, Proteobacteria. Diese Verteilung ist sowohl im Jahr 2017, wie auch im Jahr 2022 zu

beobachten (Abb. 7). Im Vergleich zu den Daten von den Pilzen, lässt sich aber bei den Bakterien in den Daten eher eine Abnahme der Diversität beobachten (etwa beim Vergleich der Shannon-Indices), wobei jedoch in erster Linie der Standort Innergschlöss hervorsteht. Auch bei den Bakterien gilt, dass eine hohe Variabilität in den Daten vorliegt. Auch hier gilt, wie bei den Pilzen, dass allgemeine Trends sich aus den einzelnen Zahlen schwer ablesen lassen. 875 Bakterien wurden nur 2017 gefunden, während 2411 im ausschließlich im Jahr 2022 gefunden wurden, 12637 Bakterienstämme wurden sowohl in 1017 als auch 2022 gefunden (weil das Gesamtzahlen sind, aber nicht Gemeinschaften vergleichen, stehen die Zahlen in scheinbarem Widerspruch zu einer Abnahme der Diversität).

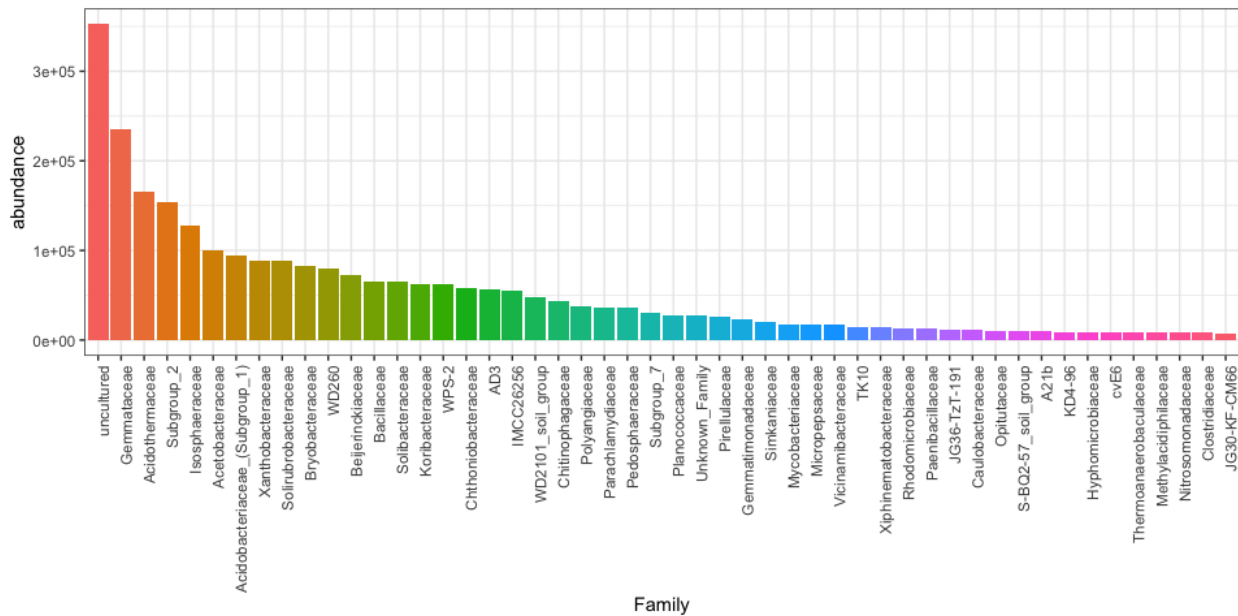


Abbildung 6: Relative Häufigkeiten der gefundenen Bakterienfamilien in der Beprobung 2022.

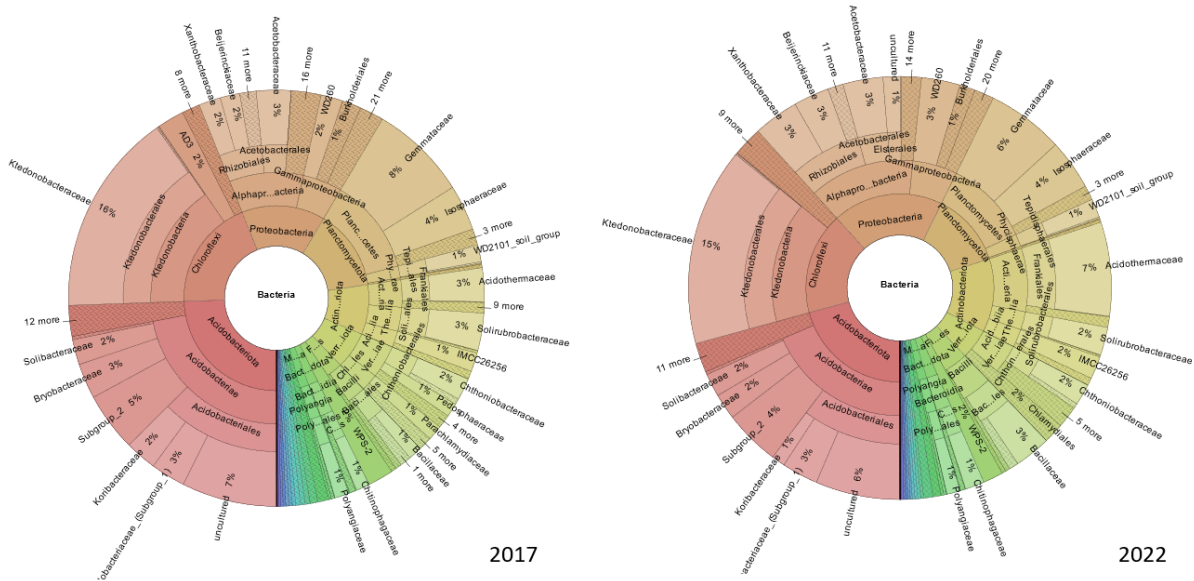


Abbildung 7: Hierarchische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften im Vergleich von 2017 und 2022

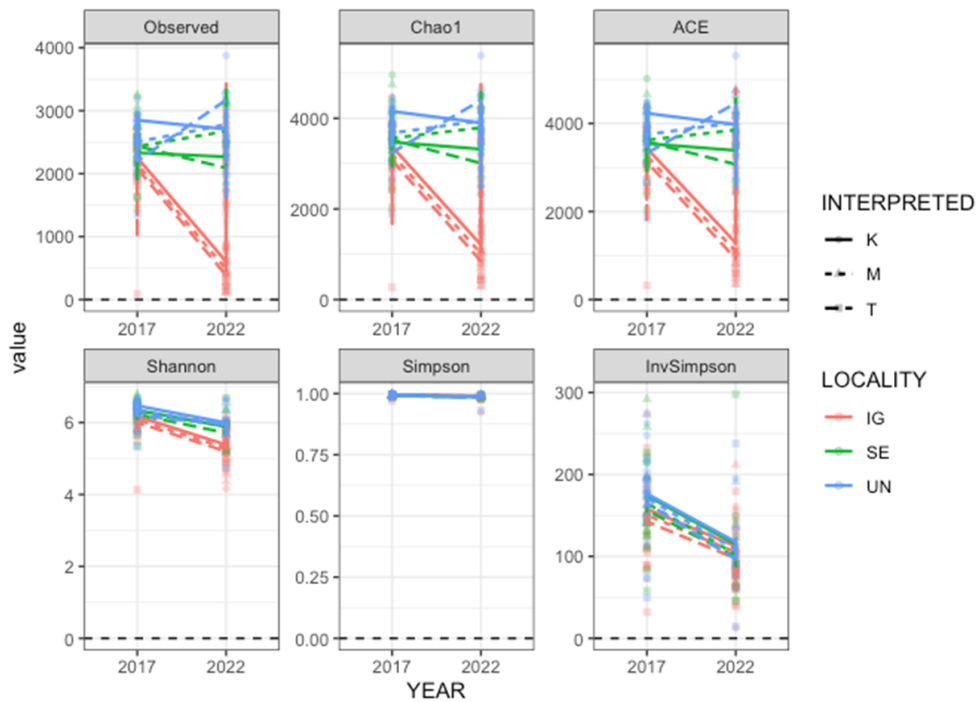


Abbildung 8: Diversität der Bakterien im Vergleich von 2017 und 2022. Bezeichnungen der Gradientenanteile: K..Kopf, M..Mitte, T..Tief. Standorte: IG..Innerschlöß, SE..Seebachtal, UN..Untersulzbachtal.

Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse zusammengefasst kann gesagt werden, dass größere Muster der mikrobiellen Vielfalt und die Zusammensetzung zwischen 2017 und 2022 weitgehend gleichgeblieben sind. Generell zeigt sich in allen Proben eine hohe Varianz in der Mikrobienzusammensetzung, wobei die Pilze in ihrer Zusammensetzung homogener zu sein scheinen, während die Bakterien insgesamt variabler sind. Dies könnte damit zu tun haben, dass die Pilze mit ihren Myzelien feinstandörtliche physico-chemische und biologische Variationen besser abpuffern mögen als die Bakterien, die als Einzeller sensibler auf entsprechende Veränderungen reagieren. Schließlich deutet sich noch eine tendenzielle Zunahme der pilzlichen Diversität und eine Abnahme der bakteriellen Diversität im Vergleich mit 2017 an. Ob diese Veränderungen tatsächlich bedeutsam sind, können jedoch nur Folgeuntersuchungen aufzeigen.

Die Interpretation der Ergebnisse über die Variation lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Während das Vorhandensein einzelnen Pilze oder Bakterien (hier durch Sequenzunterschiede als OTUs bezeichnet) mit großer Variabilität verbunden ist, sind die größeren Gruppen, zu denen sie gehören, vergleichsweise konstant über die Jahre in den Böden vertreten. Diese Großgruppen scheinen für die alpinen Habitats auch sehr typisch zu sein, findet man sie doch auch in vergleichbaren Untersuchungen anderer alpiner Orte. Eine Quelle für die große Variabilität einzelner Vertreter der Pilze und besonders der Bakterien im alpinen Boden liegt vermutlich in erster Linie an den kleinräumigen Unterschieden im Boden, die möglicherweise auch generelle Muster des Umweltwandels – zumindest für einige Zeit – verdecken können. (Das könnten Wurzeffekte unterschiedlicher Pflanzen sein, Insektenreste, versickernder Vogelkot, etc. sein). Man könnte diese Effekte auf zweierlei Arten minimieren für künftige Untersuchungen. Erstens wäre es denkbar, dass man hier bestimmte Parameter fixiert, etwa nur den Wurzelraum bestimmter Pflanzen untersucht, o.ä. Dies ist aber schwierig in den einzelnen Gradienten umzusetzen und widerspricht auch den Zielsetzungen des Monitoring-projektes, ein allgemeineres Bild der Veränderungen zu gewinnen. Die zweite Möglichkeit zur Verringerung kleinskaliger Effekte ist, von mehreren Stellen eines Untersuchungspunktes kleinere Proben zu entnehmen und danach als zusammengesetzte Probe (pooled sample) zu untersuchen um einzelne Abweichungen heraus zu mitteln. Möglicherweise, sind mehrere solch punktuellen Entnahme sogar schonender für die Flächen als ein breiteres Loch.

Erst mit dem Vergleich über längere Zeiträume wird sich herausstellen, inwieweit sich langfristige Veränderungen der mikrobiellen Vielfalt als Klima- oder Umweltwandelereffekte

ergeben. Es ist aber generell anzunehmen, dass mit Veränderung der Vegetationsdecke bzw. Veränderungen des Wassergehaltes im Boden, bzw. anderer physikalisch-chemischer Bedingungen immer zu einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung kommt, mit wechselseitigen Folgeeffekten für die Pflanzendecke.

LITERATUR

Fernández Mendoza F, Grube M (2019a) Langzeitmonitoring von Ökosystemprozessen im Nationalpark Hohe Tauern. Modul 04: Mikrobiologie. Methoden-Handbuch. Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Wien. DOI: ISBN-Online: 978-3-7001-8749-3, doi: 10.1553/GCP_LZM_NPHT_Modul04

Fernández Mendoza F, Grube M (2019b) Interdisziplinäres, integratives Monitoring- und Forschungsprogramm zur langfristigen, systematischen Ökosystembeobachtung im Nationalpark Hohe Tauern 2016-2019. - Modul 04: Mikrobiologie. Endbericht. Unveröffentlichter Bericht im Auftrag des Nationalparks Hohe Tauern.

Körner C (2018) Comparative, long-term ecosystem monitoring across the Alps: Austrian Hohe Tauern National Park, South-Tyrol and the Swiss central Alps. 6th Symposium for Research in Protected Areas 2 to 3 November 2017, Salzburg, 331 – 33

Körner C et al. (2020) Langzeitmonitoring von Ökosystemprozessen im Nationalpark Hohe Tauern. Synthese der Startphase 2016-2018. Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Wien. ISBN-Online: 978-3-7001-8748-6, doi: 10.1553/GCP_LZM_NPHT_Synthese

Körner, C et al. (2022). "Long-term monitoring of high-elevation terrestrial and aquatic ecosystems in the Alps – a five-year synthesis." *eco.mont (Journal on Protected Mountain Areas Research)* 14(2): 48-69.