

Endbericht 2024

Langzeitmonitoring von Ökosystemprozessen im Nationalpark Hohe Tauern 2023

Modul 04: Bodenmikrobiologie

Mit Unterstützung von



Im Auftrag von:

Sekretariat des Nationalparkrates Hohe Tauern
Kirchplatz 2
A-9971 Matri i.O. Austria

Durchführung der Arbeiten:

Prof. Mag. Dr. Martin Grube &
Dr. Fernando Fernández Mendoza
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 Innergschlöss (Tirol) ausgewählt, um diesen neuen Forschungsschwerpunkt in den Hohen Tauern aufzubauen (Körner 2018).

Ziel dieses vorliegenden Projektes war es, dieses interdisziplinäre, integrative Monitoring- und Forschungsprogramm fortzuführen und neue Daten im Jahr 2023 zu vergleichen. 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), sowie Datenerhebungen in den Jahren 2021 und 2022. 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).

Die Untersuchung der mikrobiellen Vielfalt fokussiert in unserem Projekt auf die Bakterien (und teilweise miterfassten Archaeen) und die Pilze (sowohl solche, die 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 Gesamtvieftalt und die verwandtschaftliche Zugehörigkeit der im Boden anzutreffenden Mikroorganismen ermittelt werden. Frühere verwendeten Methoden, die auf die Kultivierung von Mikroorganismen angewiesen sind, erfassen erstens nur einen kleinen Bruchteil der Biodiversität und deren Zuordnungen ohne nachträgliche Sequenzierung ungenau sind. Die überwiegende Mehrzahl der Mikroorganismen ist im Boden von anderen biologisch aktiven Organismen abhängig und daher nicht unter sterilen Bedingungen kultivierbar. Da sensible biotische Wechselwirkungen vorrangig von Umweltveränderungen betroffen sein können, ist es jedoch wichtig, 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).

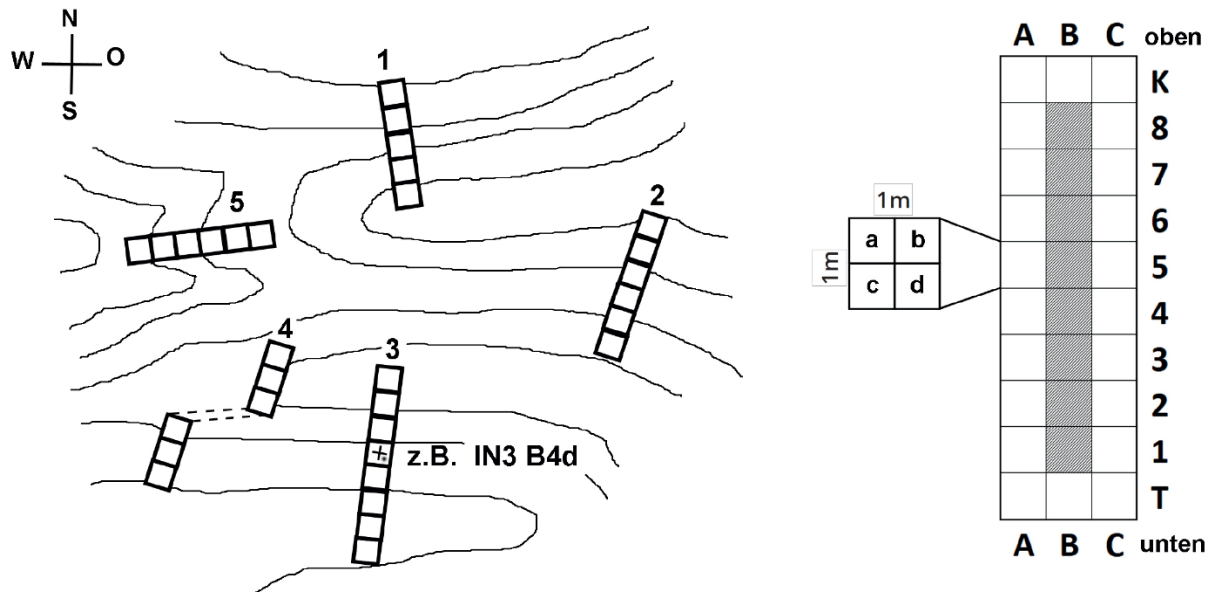


Abbildung 1: Hierarchische Feingliederung der Dauerbeobachtungsflächen (DFs). Die drei zusätzlichen Felder unten am tiefsten Punkt unten tragen die Signatur T (z. B. AT), jene am höchsten Punkt die Signatur K (z. B. AK). (aus Körner et al. 2020)

ZIELSETZUNG

Eine Herausforderung jeden Langzeitmonitorings in Natursystemen ist deren „normale“ zeitliche Variabilität, über 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. Vor allem für mikrobiologische Bodenuntersuchungen ist darüber noch wenig bekannt. So können in großem zeitlichem Abstand (über mehrere Jahre oder Jahrzehnte) durchgeführte Datenerfassungen können im schlimmsten Fall zufällig ein Minimum oder ein Maximum der natürlichen Amplitude erfassen, was eine massive Überschätzung oder Unterschätzung des tatsächlichen Trends zur Folge hat. 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 stellten 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 die Kälte längere Zeit mittels einer Kunststoffmatrix aufrechterhält. 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 ca. 13 kg schwere Kühlbehälter wurde dann zu den Standorten mit hinaufgetragen, und dort mit den Proben befüllt. So konnten die Proben in gekühltem Zustand ins Tal und ins Labor gebracht und bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden. Damit wird die nachträgliche Veränderung der Bakterien- und Pilzzusammensetzung vermieden, die sich je nach Feuchtigkeitsgehalt des Bodens ausprägt und einen Fehler in die Untersuchung einbringt.

BEARBEITUNG IM LABOR

Im Labor des Instituts für Biologie an der Uni Graz wurden die einzelnen Proben extrahiert, und dabei zuerst mit einem TissueLyser II (Retsch, Qiagen Wien) zermahlen, bevor eine DNA-Extraktion mittels DNeasy PowerSoil Pro DNA Extraction Kit (Qiagen, Wien) erfolgte. Die extrahierte DNA der Bodenproben wurde bis zur Weiterverarbeitung tiefgekühlt. 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. Diese Primer und Gene haben sich für eine Untersuchung als aussagekräftig erwiesen und sie gewährleiten auch eine große Sicherheit der kompletten Erfassung aller Bakterien und Pilze. Andere Primer, vor allem für andere Gene, amplifizieren entweder nur einen Teil der Mikroorganismen und geben so ein fehlerhaftes Spektrum der Vielfalt wieder. Der extern durchgeführte Sequenzierungsprozess lieferte danach umfangreiche Rohsequenzdaten, die von uns dann wie im Methodenhandbuch beschrieben weiterverarbeitet wurden (Fernandez Mendoza & Grube 2019a).

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 Bodenmikrobenzusammensetzung.



Abbildung 2: Impression von der Beprobung 2023 bei regnerischem Wetter im Innerschloß. Aufstieg und Beprobung (Im Bild Mitarbeiterin Jana Girstmair).

ERGEBNIS/OUTPUT

Die Beprobungen von 2023 konnten an allen drei Standorten des Nationalparks durchgeführt werden.

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 2023 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 2023 gefunden wurden (1787 Pilze wurden zu beiden Zeitpunkten gefunden).

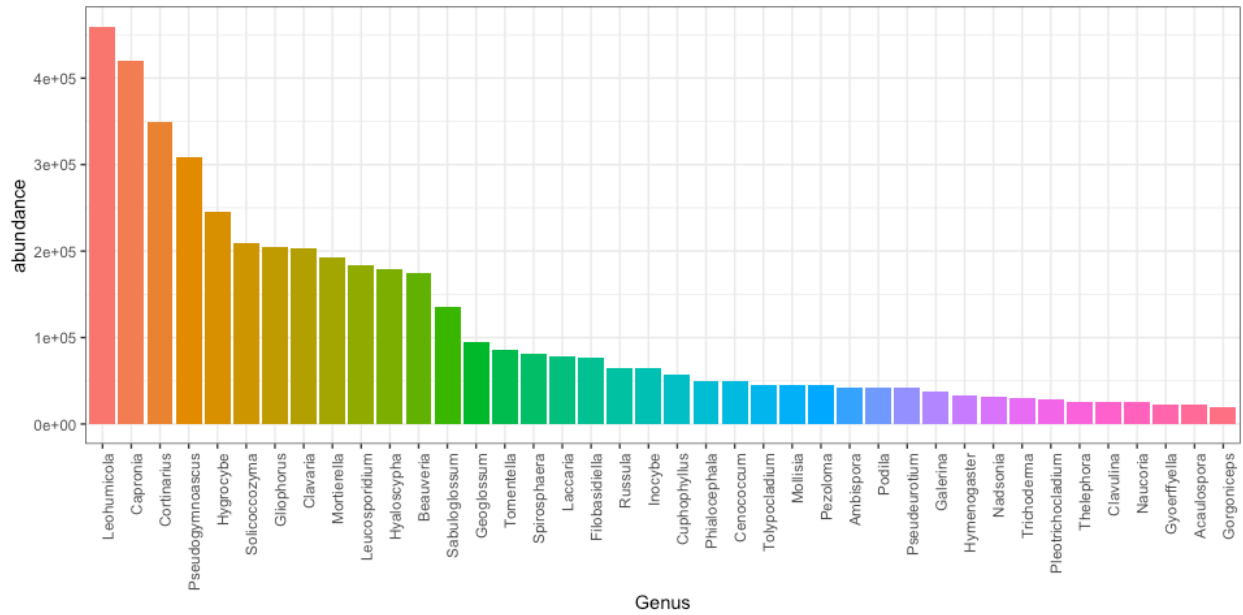


Abbildung 3: Relative Häufigkeiten der gefundenen Pilzgattungen in der Beprobung 2023.

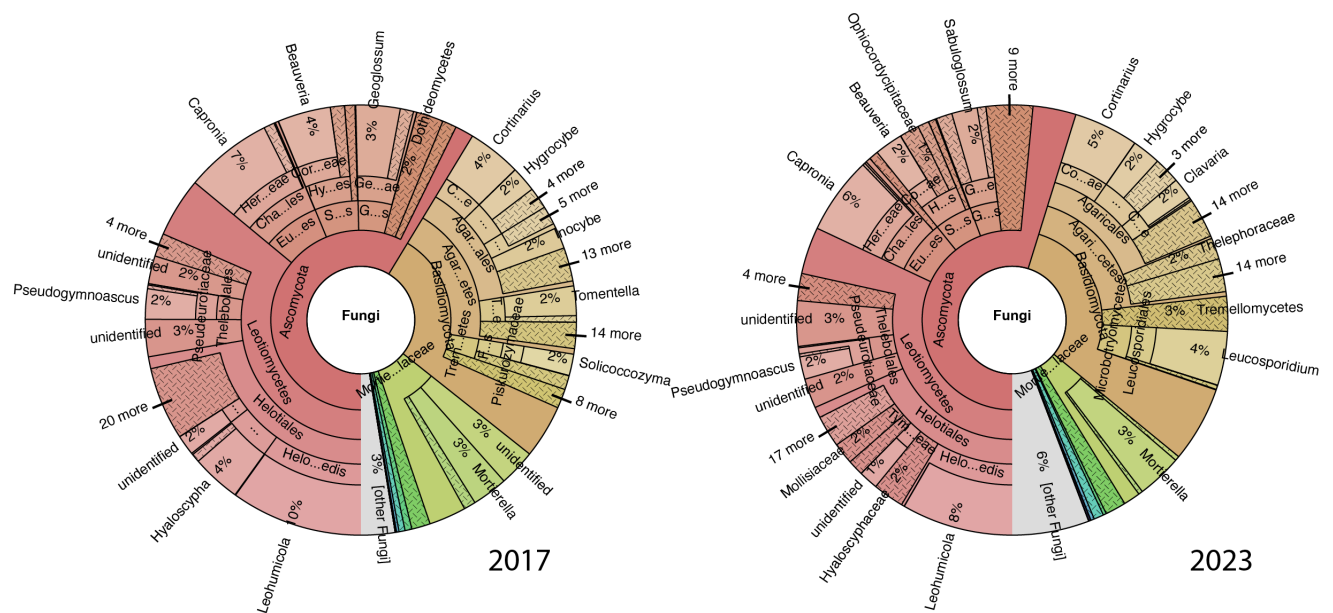


Abbildung 4: Hierarchische Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften im Vergleich von 2017 und 2023

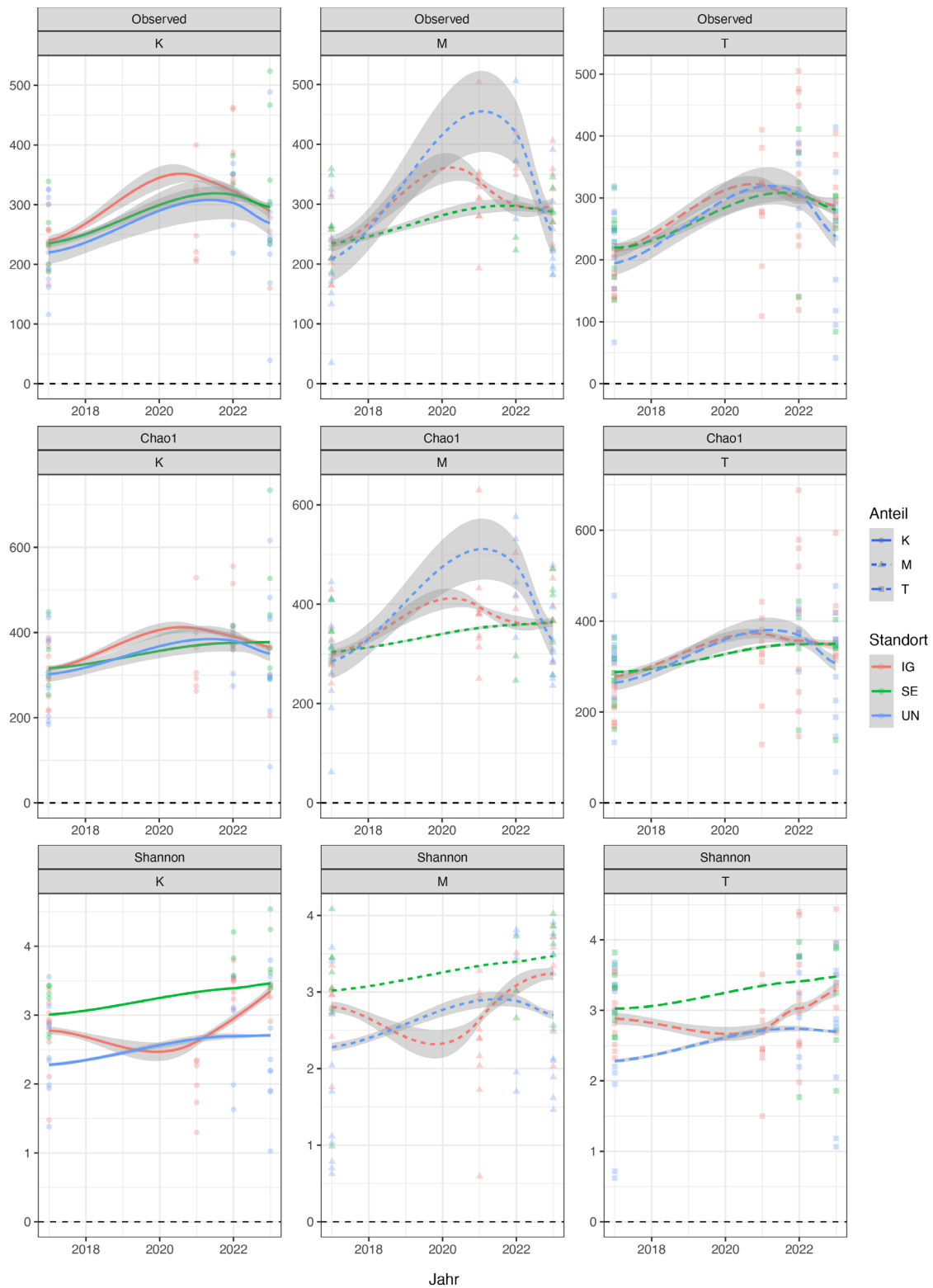


Abbildung 5: Diversitätsindices der Pilze durch die Chronosequenz zwischen 2017 und 2023. Bezeichnungen der Gradientenanteile: K.Kopf, M.Mitte, T.Tief. Standorte: IG..Innerschlöß, SE..Seebachtal, UN..Untersulzbachtal.

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 2023 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 hervorsticht. 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 2017 als auch 2023 gefunden (weil das Gesamtzahlen sind, aber nicht Gemeinschaften vergleichen, stehen die Zahlen in scheinbarem Widerspruch zu einer Abnahme der Diversität).

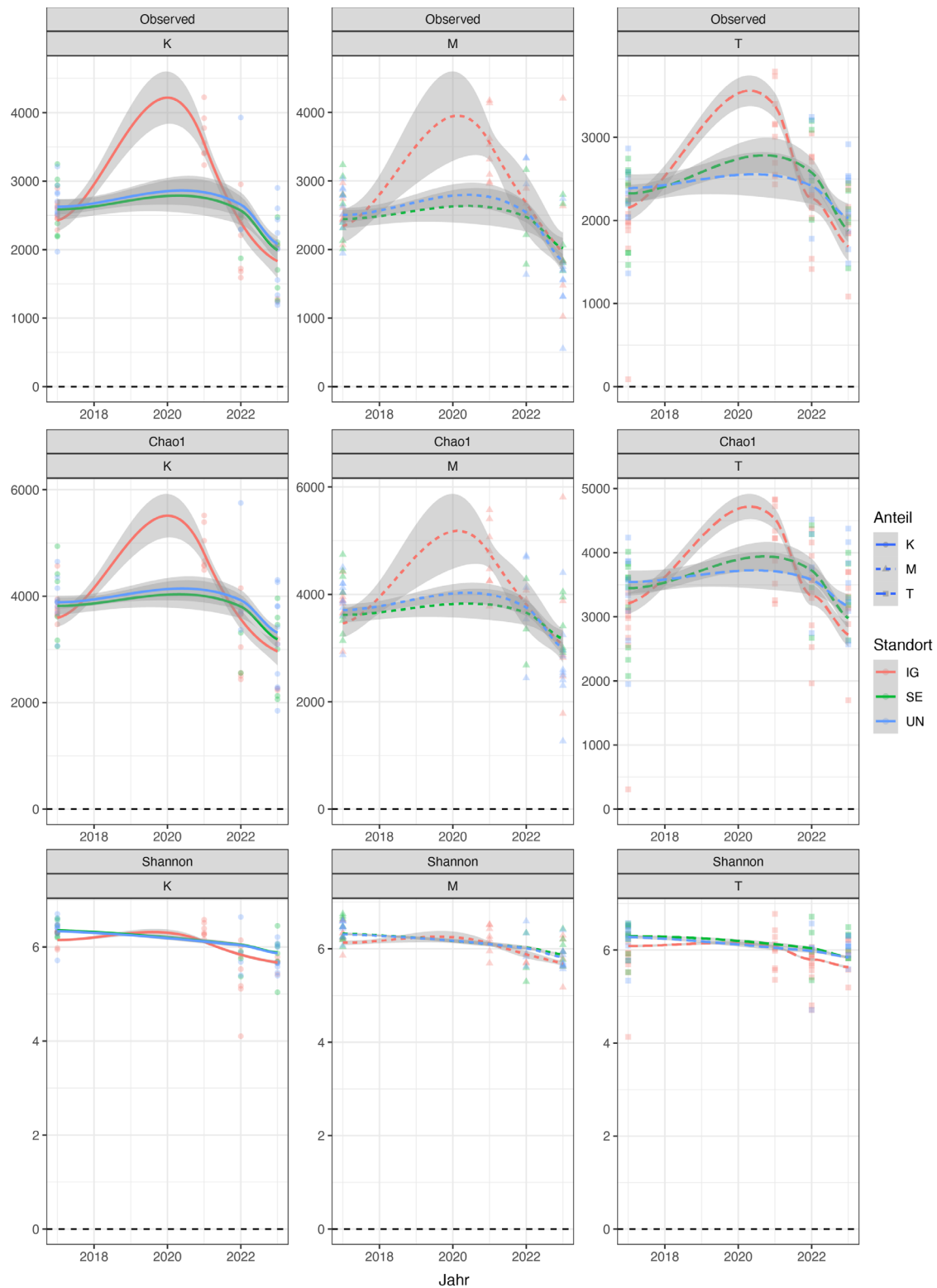


Abbildung 8: Diversität der Bakterien im Vergleich von 2017 und 2023. Bezeichnungen der Gradientenanteile: K.Kopf, M..Mitte, T..Tief. Standorte: IG..Innerschlöß, SE..Seebachtal, UN..Untersulzbachtal.

Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse zusammengefasst kann gesagt werden, dass größere Muster der mikrobiellen Vielfalt und die Zusammensetzung zwischen 2017 und 2023 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 physiko-chemische und biologische Variationen besser abpuffern mögen als die Bakterien, die als Einzeller sensativer auf entsprechende Veränderungen reagieren. Schließlich deutet sich noch eine tendenzielle Zunahme der pilzlichen Diversität und eine Abnahme der bakteriellen Diversität im Vergleich mit den Erstuntersuchungen von 2017 an.

Die Interpretation der Ergebnisse über die Variation bestätigen daher einige frühere Interpretationen. Insgesamt habe wir es mit einer großen Variabilität im Vorhandensein näher verwandter Mikroorganismen zu tun. Während das Vorhandensein individueller Pilze oder Bakterien (hier durch Sequenzunterschiede als OTUs bezeichnet) mit großer Variabilität verbunden ist, bleiben allerdings die größeren Mikroorganismengruppen, zu denen sie gehören, vergleichsweise gleichmäßig über die Jahre in den Böden vertreten. Die Zusammensetzung mit diesen Verwandtschaftsgruppen ist für die alpinen Habitate auch typisch, da man sie doch auch in vergleichbaren Untersuchungen anderer alpiner Orte findet. Eine Quelle für die große Variabilität einzelner Vertreter der Pilze und besonders der Bakterien im alpinen Boden liegt vermutlich in erster Linie an ihrer ökologischen Bindung an den Wurzelraum von Pflanzen und den damit verbundenen kleinräumigen Unterschieden im Boden, die möglicherweise auch generelle Muster des Umweltwandels – zumindest für einige Zeit – verdecken können. Zahlreiche Untersuchungen haben eine spezifische Besiedelung der Rhizosphäre von Pflanzen ergeben. Die Rhizosphäre ist der unmittelbar von ihnen beeinflusste Umgebung der Wurzeln. Diese Spezifität wird unter anderem durch die artspezifische Zusammensetzung von Wurzelabscheidungen bedingt. Die Exsudate enthalten chemische Komponenten, die auf Aktivität und Wachstum von Bakterien und Pilzen unterschiedlich wirken. So kann die enge Verzahnung von Wurzeln verschiedener Pflanzenarten zu hoher Variabilität der bakteriellen Mikroorganismen führen. Weiters können im Boden absterbende Insektenreste, versickernder Vogelkot, etc. dazu beitragen.

Bakterien sind vorwiegend als einzellige Organismen vorhanden, die unterschiedlich große Kolonien ausbilden können. Die kann auch für die Pilze zutreffen, deren – allerdings deutlich größeren Zellen – als Hefen in alpinen Böden auftreten können, dort vor allem in

Rohböden etwa in Gletschervorfeldern. Viele Pilze, besonders jene, die mit Pflanzen assoziiert sind, wachsen hingegen als mehr oder weniger zusammenhängende Myzelien, die einen Transport von Nährstoffen durch einen fadenförmigen Verbund gewährleisten. Daraus erklärt sich, dass sich die Diversitätsmuster von Pilzen und Bakterien in den Böden unterscheiden können und dabei die Pilze in etwas homogener Verteilung und mit weniger Arten im Boden auftreten können.

Die Analyse der im Boden vorhandenen DNA mit der Aktivität der Bodenorganismen muss weitere Punkte berücksichtigen. Da die Sequenzierung auf dem PCR Nachweis von Sequenzabschnitten beruht, die in unterschiedlicher Anzahl in den Zellen auftreten, ist das Ergebnis eine Erhebung der relativen Anteile diese Sequenzen in der Bodenprobe. Das schließt auch DNA von Mikroorganismen ein, die aus unterschiedlichen Gründen inaktiv im Boden vorhanden sind. Sie können Ruhestadien von früher aktiven Mikroorganismen sein, oder unverdaute tote Zellen, oder als Ausbreitungsformen (Sporen) in den Boden eingetragen worden sein. Ein direkter Rückschluss von der durch die Sequenzierung festgestellten Diversität auf funktionelle Muster ist daher nicht direkt, sondern erst nach Berücksichtigung der Biologie der festgestellten Organismen möglich.

Es gibt nun zwei Möglichkeiten, wie man mit hoher Variabilität in den Proben am besten umgeht. Man kann versuchen, eine gemittelte Verteilung durch eine Erhöhung der Beprobungszahl zu erreichen. Dies kann durch die Entnahme an weiteren Stellen der Gradienten erfolgen, ist aber nicht ratsam, da die Streifen durch zu viele Beprobungen langfristig belastet würden. Als Abwandlung davon wäre es eher geeignet, von mehreren Stellen eines Untersuchungspunktes kleinere Proben zu entnehmen und diese danach als zusammengesetzte Probe (pooled sample) zu untersuchen. Möglicherweise, sind mehrere solch punktuellen Entnahme sogar standortschonender als ein breiteres Loch. Andererseits wäre es denkbar, dass man hier bestimmte Parameter festlegt, und etwa nur den Wurzelraum bestimmter Pflanzen untersucht. Dies widerspräche aber einerseits der Vorgabe des Monitoring-projektes, ein allgemeineres Bild der Veränderungen zu gewinnen. Die Vorgangsweise ist aber schwierig in den einzelnen Gradienten umzusetzen, falls die Pflanzen nicht überall vorhanden sind und die klare Identifizierung der beprobten Wurzeln schwierig ist.

Der Vergleich über die letzten Jahre zeigt ansatzweise Trends, aber erst nach längeren Zeiträumen der Untersuchung wird sich herausstellen, inwieweit sich langfristige Veränderungen der mikrobiellen Vielfalt als Klima- oder Umweltwandeleffekte ergeben. Es ist aber generell anzunehmen, dass mit Veränderung der Vegetationsdecke bzw. Veränderungen des Wassergehaltes im Boden, bzw. anderer physikalisch-chemischer

Bedingungen klare Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung kommt, mit wechselseitigen Folgeeffekten für die Pflanzendecke. Die Ergebnisse aus dem Projekt liefern hier wertvolle Basisinformationen, um die rückbezüglichen Wirkungen zwischen Makroorganismen, die die Pflanzendecke ausmachen, und den assoziierten Mikroorganismen im Bodenraum, im Sinne einer „Ökologie auf verschiedenen Ebenen“ (multiscale ecology) zu entwickeln.

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.