

Das Eis der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle als Lebensraum für mikrobielle Gemeinschaften

ZUSAMMENFASSUNG

Es ist gut dokumentiert, dass im und auf dem Eis der Erdoberfläche Viren, Bakterien, Algen, Pilze und gelegentlich auch vielzellige Tiere siedeln. Über die metabolisierenden und reproduzierenden Mikroorganismen des Höhleneises ist hingegen sehr wenig bekannt. Erst in jüngster Zeit, mit der Entwicklung feinerer Analysemethoden, wurde das Höhleneis als Lebensraum mikrobieller Gemeinschaften überhaupt wahrgenommen. Die harten Lebensbedingungen – konstant tiefe Temperaturen, Nährstoffknappheit und das teilweise bis vollständige Fehlen von Licht – erfordern spezielle Anpassungen dieser Organismen.

Die Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle nördlich von Wörgl in Tirol enthält mehrere Meter mächtiges Bodeneis, das stellenweise bis zu ca. 2000 Jahre alt sein dürfte. Mittels Bohrkernen wurden die bakteriellen Gemeinschaften erfasst und im Hinblick auf Zellzahlen, Biodiversität und Produktivität untersucht. Der Großteil der sequenzierten Organismen konnte den Actinobacteria zugeordnet werden, einem der artenreichsten Stämme unter den Bakterien. Erstaunlicherweise wurden auch Cyanobacteria detektiert, welche Licht für ihren Stoffwechsel benötigen. Sie wurden von außen eingeschwemmt und müssen hier, im Gegensatz zu Organismen auf einer Gletscheroberfläche, mit dem wenigen Restlicht zurechtkommen, das durch die Schächte dringt. In ihrer Biodiversität und der Kapazität, organischen Kohlenstoff zu produzieren, ähneln die Mikroben des Höhleneises jenen Gemeinschaften, die in Akkumulationen von organischem und anorganischem Material auf der Gletscheroberfläche (Kryokonit) leben. Der Großteil der in der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle gefundenen Stämme ist charakteristisch für kalttemperierte Lebensräume.

ABSTRACT

Ice in the Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle as a habitat for microbial communities

It is well known that viruses, bacteria, algae, fungi and occasionally also metazoans can thrive on top or within the ice of various environments. However, virtually nothing is known about the metabolism and reproduction of cave ice dwelling microbes. With the recent improvements in methodological techniques cave ice has been recognized as living space of microbial communities. Harsh living conditions such as constantly low temperatures, low nutrient concentrations and the lack of light require specific adaptations of these cave dwelling organisms.

Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle is a small sag-type cave north of Wörgl, Tyrol, which contains up to several metres thick floor ice. Radiocarbon analyses suggest that this ice may be up to ca. 2000 years old in some places. Core samples of this ice were used to provide a preliminary characterization of the bacterial communities regarding cell numbers, productivity and biodiversity via cultivation-based methods. The majority of sequenced phyla could be attributed to Actinobacteria which in general represent the highest species diversity amongst bacteria. Surprisingly, also cyanobacteria, which depend on light to be photosynthetically active, could be detected. Most likely they have been introduced from outside and have to cope with the low light concentration in the cave. With respect to their biodiversity and their capacity to assimilate organic carbon, the microbes identified in this study strongly resemble communities known as cryoconite, i.e. accumulations of organic and inorganic material on alpine glaciers. The majority of the detected species is characteristic of cold environments.

**Birgit Sattler
Philipp Larch
Julia Rambacher,**

Universität Innsbruck, Institut für Ökologie,
Technikerstrasse 25, 6020 Innsbruck
birgit.sattler@uibk.ac.at
philipp.larch@student.uibk.ac.at
julia.rambacher@student.uibk.ac.at

Christoph Spötl

Universität Innsbruck, Institut für Geologie,
Innrain 52, 6020 Innsbruck
christoph.spoetl@uibk.ac.at

Eingelangt: 3.6.2013
Angenommen: 9.8.2013

EINLEITUNG

Lebensbedingungen in der Kryosphäre

Eis und Schnee galten bis vor kurzem als lebensfeindliche Wüsten. Doch dieses Bild hat sich grundlegend verändert, weil die Bedeutung der eisbedeckten Gebiete unserer Erde – der Kryosphäre – unter anderem auch für Fragen des aktuellen Klimawandels erkannt wurde (Psenner & Sattler, 1998). Gleichzeitig kam es zu Verbesserungen in der Analysetechnik und in der Logistik für Untersuchungen in Eislebensräumen. Wir wissen heute, dass die Kryosphäre eine Vielzahl diverser Lebensräume (Habitate) umfasst, welche von spezialisierten Organismen besiedelt werden (Psenner et al., 2003). Die Gemeinschaften sind von Viren, Bakterien, Algen und Pilzen dominiert; Tardigrada (Bärtierchen) und Copepoda (Ruderfußkrebse) gehören zu den wenigen Tiergruppen, welche sich in diesen Lebensräumen etablieren konnten. Die Bedingungen sind generell hart und erfordern entsprechende Anpassungen (Morita et al., 1975). Lebensräume, die mit der Außenwelt in Kontakt stehen, sind geprägt von tiefen Temperaturen mit zum Teil großen Schwankungen. Wiederholte Gefrier- und Tauzyklen im Tagesgang stellen an den Stoffwechsel einer Zelle große Anforderungen. Der Organismus muss durch eine geeignete Kombination von Enzymen verhindern, dass das Zellwasser bei Temperaturen unter 0°C gefriert und durch die Bildung von Eisnadeln die Zellmembran beschädigt wird. Spezielle Gefrierschutzproteine sind charakteristisch für Anpassungen an die Kälte und ermöglichen auch ein Einfrieren über längere Perioden, ohne dass der Organismus beim Auftauen Schaden erleidet.

Zudem werden speziell die Oberflächengemeinschaften von Eis- und Schneelebensräumen durch hohe UV-Strahlung belastet, was einen Schutz durch Pigmentierung oder eine effiziente DNA-Reparatur im Falle einer Schädigung des Erbmaterials erfordert. Schließlich sind die meisten glazialen Lebensräume durch Nährstoffarmut gekennzeichnet. Es kann jedoch beim Ausfrieren oder Umkristallisieren von Schnee und Eis zu lokalen Anreicherungen von Nährstoffen kommen, die sich in den Zwischenräumen der Schnee- bzw. Eiskristalle sammeln und somit mikrobielles Leben unterstützen (Psenner & Sattler, 1998). Ein aktiver Stoffwechsel braucht flüssiges Wasser für den Austausch von Nährstoffen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Manche Organismen können bei sehr tiefen Temperaturen den Stoffwechsel auf ein Minimum reduzieren: sie überleben in Kryobiose, einer Art Kältestarre. Flüssiges Wasser, sei es auch nur ein Mikrofilm auf mineralischen und organischen Partikeln, kann die mikrobielle Aktivität

wieder in Gang setzen. Allein durch den mechanischen Druck, welcher auf eine Zelle während des Gefrier- und Tauprozesses einwirkt, wird von der Zellmembran gleichzeitig Stabilität und Flexibilität gefordert. Diese erhält sie durch den erhöhten Einbau bestimmter Lipide, und zwar der ungesättigten cis-Fettsäuren. Die Ausstattung eines Organismus mit verschiedenen Lipiden gibt somit auch Auskunft über dessen Lebensbedingungen (Hebraud, 1999). Die speziellen Gefrierschutzproteine, Pigmente und Lipide ermöglichen angepassten Organismen ein Leben im Eis; viele dieser Stoffwechselprodukte bieten sich für eine biotechnologische Nutzung an.

Der belebte Teil der Kryosphäre ist mannigfaltig. Mikroben besiedeln Meereis, Süßwassereis und

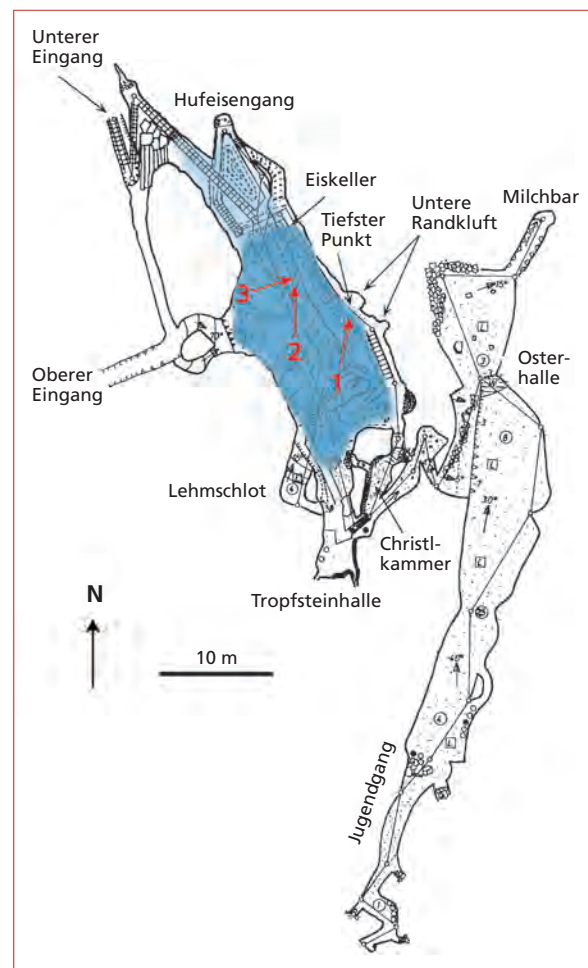


Abb. 1. Grundrissplan der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle mit den Bohrpunkten. Der Schnee- und Firnbereich im nördlichen Höhlenteil ist hellblau unterlegt, der Haupteisbereich ist mit einem dunkleren Blau gekennzeichnet.

Fig. 1: Plan view of the Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle with sampling points. Snow and firn deposits in the northern part of the cave are shown in light blue, and the main ice-bearing area is shown in deep blue.

Permafrostböden, die Oberfläche, das Innere und den Untergrund von Gletschern sowie die gesamte nivale Zone (Psenner et al., 2003). Auch das Höhleneis kann zu den Habitaten der Kryosphäre gezählt werden. Durch das Fehlen bzw. die schwache Ausprägung von Tag-Nacht-Zyklen sind in Höhlen aber nicht alle selektiven Faktoren wirksam. Die wiederholten Gefrier- und Tauperioden sind praktisch nicht existent (außer in Schauhöhlen, wo künstliche Lichtquellen die Lufttemperatur geringfügig erhöhen können), ebenso fällt der Stress durch die oberflächliche UV-Strahlung weg. Vor allem aber fehlt in Höhlenhabitaten die photosynthetisch aktive Strahlung zwischen 400 und 700 nm, was zu einem Überhang an heterotrophen Organismen führt, deren Ernährung auf organischen Stoffen anderer Lebewesen beruht. Nur in der Nähe von Höhleneingängen beeinflusst Lichteinfall die Zusammensetzung der Artengemeinschaft (Barr, 1967). Spalten und Eingänge haben jedoch noch eine weitere ökologische Funktion. Durch sie werden Nährstoffe mittels konvektiver und barometrischer Luftzirkulation in die Höhle gesaugt, wo sie akkumulieren können. Niederschläge und Schmelzwasser lösen auf ihrem Weg durch das Gestein Mineralstoffe aus dem Fels (Boston et al. 2001; Melim et al. 2009); sie transportieren aber auch gelöste und partikuläre organische Substanz und können so zu bedeutenden Stoffeinträgen

UNTERSUCHUNGSGEBIET

Die Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle (47° 32' N, 12° 1' O, 1515 m Seehöhe, Katasternummer 1266/1, Abb. 1) im Wettersteinkalk nördlich von Wörgl stammt vermutlich aus dem Tertiär. Obwohl ihre beiden schachtartigen Eingänge den Hirten des angrenzenden Almgebietes schon lange bekannt waren, wurde sie erst 1921 durch L. Weirather und O. Hossé befahren (Spötl, 2013). Mit der Gründung des Landesvereins für Höhlenkunde in Tirol (1952) setzten wissenschaftliche Untersuchungen ein. Seit 1967 ist die Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle während der Sommermonate für das Publikum geöffnet. Die älteste Schauhöhle Tirols (Spötl, 2002) wird jährlich von ca. 2000 Gästen besucht. Das Besondere dieser Höhle ist das gemeinsame Vorhandensein von Tropfsteinen im unteren Bereich sowie von Eis im oberen Höhlenbereich. Das Höhleneis dürfte – anhand von Radiokarbon-datierten Holzeinschlüssen zu urteilen – lokal bis zu 2000 Jahre alt sein (Pavuzza und Spötl, 2000; Spötl, unpublizierte Daten); somit ist es vielleicht das älteste Eis Tirols. An der dicksten Stelle misst das Eis ca. 7 m. Allerdings ist dieser Eiskörper bereits durch Schmelzprozesse in Mitlei-

in das Höhlensystem führen (Culver & Pipan, 2009). Über Tagöffnungen und Sickerwässer werden Höhlen nicht nur mit Nährstoffen versorgt, sondern auch besiedelt. Die relative Luftfeuchtigkeit im Inneren der Höhlen liegt, anders als in Eingangsnähe, meist bei fast 100% (de Freitas et al., 1982; de Freitas & Littlejohn, 1987). Die Höhlenluft hat prinzipiell die gleiche Zusammensetzung wie die atmosphärische an der Oberfläche, sie weist aber in vielen Fällen einen höheren Gehalt an Kohlendioxid auf (z.B. Ek & Gewalt, 1985; Baldini et al., 2006). Die Legende von der nahezu keimfreien Höhlenluft (z.B. Michie, 1997) wird u.a. durch die vorliegende Studie widerlegt. Jeglicher Luftstrom transportiert zumindest eine geringe Anzahl von Bakterien bzw. Pilz- oder Algensporen.

Organismen aus diversen Eislebensräumen waren bereits Gegenstand ökologischer und physiologischer Untersuchungen. Über den Stoffwechsel und das Reproduktionspotenzial der Organismen des Höhleneises ist hingegen sehr wenig bekannt (z.B. Margesin et al., 2004). Ziel dieser Studie war eine grobe Bestandsaufnahme der mikrobiellen Gemeinschaften aus dem Höhleneis der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle im Hinblick auf die systematische Zugehörigkeit und die Zellzahl von hetero- und autotrophen Organismen, deren Produktivität, sowie eine kurze Beschreibung der biogeochemischen Parameter.

denchaft gezogen, obwohl der Eingang höher liegt und daher im Sommer warme Luft kaum eindringen kann. In der *Tropfsteinhalle* am südlichen Ende der Höhle (Abb. 1) finden sich karbonatische Wandsinter, die von Rissen durchzogen und z.T. bereits heruntergebrochen sind. Zwei Sinterproben aus der anschließenden *Christkammer* ergaben Alter von 174.000 und >350.000 Jahren (Spötl, 2005). Im unteren, eisfreien Höhlenteil findet sich stellenweise großflächig weiße, weiche Bergmilch, ein Kalkpräzipitat mit feinsten Kalzitkristallen. Bemerkenswert an der Bergmilch ist das Vorhandensein einer aktiven, psychrophilen (kälteliebenden) Mikrobengemeinschaft, welche auch pigmentierte Arten von wahrscheinlich oberirdischer Herkunft enthält (Reitschuler et al., 2012).

Im oberen Teil der Höhle, welcher stark dem Einfluss von Luftströmungen (im Winter) ausgesetzt ist, nimmt Eis einen bedeutenden Teil des Höhlenbodens ein. Die Eisoberfläche akkumuliert den Input von organischem und anorganischem Material, welches mit Luftströmungen, Schnee, Wasser oder durch Besucher eingebracht wird.

METHODIK

Beprobung: Drei Eiskerne mit 7,25 cm Durchmesser wurden neben dem Besucherweg entnommen (Abb. 1). Am *Tiefsten Punkt* (Probenstelle 1) wurde etwa 1,5 m über der Eisbasis ein horizontaler Kern mit der Gesamtlänge von 1 m gezogen. Holzreste aus diesem Bereich nahe der Basis des Eises stammen großteils aus dem 13. Jahrhundert n. Chr. (C. Spötl, unveröff. Daten). Im *Eisdome* wurden zwei vertikale Kerne dem Bodeneis entnommen. Sie sind kürzer, weil bei Probenstelle 2 der Bohrer in ca. 40 cm, bei Probenstelle 3 in ca. 20 cm Tiefe durch Gestein im Eis blockiert wurde. Die Kerne 2 und 3 wurden nicht datiert, sie dürften aber deutlich jünger sein als Kern 1.

Der handbetriebene Kovacs Eisbohrer (Abb. 2) wurde vor der Probennahme mit 96%igem Ethanol und partikelfreiem destilliertem Wasser gereinigt. Die nummerierten, je 20 cm langen Teilstücke der Kerne wurden in sterile Flüssigprobenbeutel (Whirlpacs, Lactan) abgepackt und in Kühlboxen in gefrorenem Zustand in das Labor transportiert. Dort wurden die Außenschichten der Teilstücke mit einem sterilen Messer entfernt, um mögliche zurückgebliebene Kontaminationen durch den Bohrer zu beseitigen. Die Teilstücke wurden schließlich in frischen Sterilbeuteln bei 4°C im Dunkeln aufgetaut.

Chemische Analysen: Aus dem Schmelzwasser wurden Aliquote entnommen für die Bestimmung des pH-Wertes (gemessen mittels WTW pH530), der elektrischen Leitfähigkeit (gemessen mittels WTW LF 196) sowie zur Analyse des Gesamtphosphors (Molybdat-Methode nach Vogler, 1965). Aus dem Filtrat (filtriert durch Whatman GFF) wurde die Menge des gelösten

organischen Kohlenstoffes (DOC) mit einem Shimadzu TOC-5000 ermittelt.

Bakterielle Zellzahlen: Zur Bestimmung der aktuellen bakteriellen Zellzahl wurden jeweils 15 mL des Schmelzwassers zur Vermeidung eines weiteren Zellwachstums mit sterilfiltriertem (0,22 µm) Formol versehen. Zehn mL wurden daraufhin auf einem Polycarbonatfilter der Porenweite 0,22 µm aufkonzentriert. Auf dem Filter erfolgte die Färbung der DNA mit dem interkalierenden Farbstoff DAPI (Di-amidino-phenylindol, Sigma-Aldrich) nach Porter & Feig (1980). Nach einer Einbettung des Filters in Immersionsöl wurden die Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop (ZEISS Axiophot) bei einer Vergrößerung von 1250x gezählt. Unter Grünanregung konnten über die Autofluoreszenz des Chlorophylls die autotrophen Organismen unterschieden werden.

Bakterielle Kohlenstoffproduktion: Die bakterielle Kohlenstoffproduktion wurde über die Einbauraten von Tritium-markiertem Leucin ermittelt (Takacs & Priscu, 1998). Aus dem Einbau dieser Aminosäure in die Proteinfraction kann auf die Kohlenstoffproduktion geschlossen werden. Dazu wurden jeweils Triplikate (à 20 mL) aus dem Schmelzwasser mit ³H-Leucine (Fischer Scientific, spezifische Aktivität 86 Ci/mmol) für 4 Stunden bei in-situ Bedingungen inkubiert. Zur Quantifizierung von abiotischen Prozessen wurden jeweils 2 Parallelen (à 20 mL) vor der Zugabe des Markers mit Formol (4% Endkonzentration) fixiert. Die Reaktion der Lebendproben wurde mit Formol gestoppt, danach wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung im Labor kühl und dunkel gelagert. Die



Abb. 2: Eiskernbohrung am Tiefsten Punkt.
Fig. 2: Ice-core drilling at Tiefsten Punkt.

Zellextraktion erfolgte mit Trichloressigsäure (TCA, 5%) direkt auf dem Filter, welcher danach mit Szintillationscocktail versehen wurde, um die verbleibende Radioaktivität zu messen. Die Radioaktivität, welche proportional zur Einbaurate des Markers ist, wurde in dpm (disintegrations per minute, Zerfälle pro Minute) in einem Liquid Szintillation Counter (LSC 6000 IC) erfasst. Der Szintillationscocktail fungiert dabei als „Übersetzer“ von β -Strahlung in für das Gerät messbare Lichtimpulse.

Kultivierung: Für die Kultivierung der Eiskernproben wurden Agarplatten mit einem R2A-Agar gegossen, der sich speziell für Organismen aus oligotrophen Habitaten eignet, weil er Nährstoffe wie Glukose, Stärke und $MgSO_4$ sowie Hefeextrakt und Pepton in sehr geringen Konzentrationen enthält. Die Proben wurden als Duplikate angelegt und im Dunkeln bei 4°C kultiviert. Ab einem makroskopisch sichtbaren Wachstum (nach frühestens 2 Wochen) wurden die Kolonien mittels Impföse einzeln auf frische Agarplatten mit R2A-Agar übertragen und rein kultiviert.

Biodiversität: Nach Wachstum von sichtbaren Einzel-

kolonien auf den Agarplatten wurde die Biomasse mittels Impföse von den Platten gepickt und in die DNA-Extraktion überführt (modifiziertes Protokoll zu einem PowerSoil DNA Kit von Mo Bio Laboratories, Inc.). Die so gewonnene DNA wurde als Template für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) mit universellen Bakterienprimern (27f sowie 1492r) herangezogen. Das Ergebnis einer erfolgreichen Amplifikation der DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Nach Überprüfung auf mögliche Kontaminationen mittels einer Negativkontrolle wurde das PCR-Produkt an ein Sequenzierservice in Korea (Macrogen) versandt. Eine erste Auswertung und Zuordnung der Sequenzen erfolgte durch die Firma Macrogen mit der Sequenzdatenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nach dem Zuschneiden der Sequenzen durch eine optische Kontrolle der Elektropherogramme wurden die Sequenzen den einzelnen Klassen und Phyla mittels des Internet-Tools „Classifier“ Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) zugeordnet.

ERGEBNISSE

Die Eiskerne zeigten durchgehend ein erhöhtes Vorkommen von Partikeln und Mineralien in der Eismatrix und besonders an der exponierten Oberfläche. Neben den mineralischen Einschlüssen, welche nicht quantifiziert wurden, zeigt sich das Eis milchig-trüb, was auf zahlreiche Luftporen hindeutet.

Da die drei entnommenen Kerne unterschiedliche Gesamtlängen haben, können nur die Oberflächensegmente, welche allen drei Kernen gemeinsam sind, direkt miteinander verglichen werden. Minima und Maxima werden von allen Teilstücken angegeben.

Physikochemische Parameter

Der pH-Wert lag zwischen 7,66 (im Teilstück 20–40 cm des Kernes 2) und 8,49 (40–60 cm Kern 1) (Mittelwert $7,99 \pm 0,12$; Abb. 3).

Die elektrische Leitfähigkeit schwankte zwischen $44,6 \mu S/cm$ (20–40 cm Kern 1) und $66,8 \mu S/cm$ im einzigen Teilstück des Kernes 3 (Mittelwert $55,8 \pm 10,4$). Die höchste Konzentration an Gesamtphosphor (P_{tot}) lag bei $380,2 \mu g/L$ (0–20 cm Kern 3), die niedrigste bei $173,2 \mu g/L$ (40–60 cm Kern 1) (Mittelwert $306,9 \pm 64,8$).

Der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) zeigte bei allen drei Kernen die höchste Konzentration im obersten Teilstück. Als Minimum wurde $512 \mu g C/L$ gemessen (20–40 cm Kern 2), als Maximum $1878 \mu g$

C/L (0–20 cm Kern 3) (Mittelwert: $1669,7 \pm 167,0$). Mit Ausnahme des pH-Wertes wies das stark gefärbte Oberflächensegment des Kernes 3 bei allen Parametern die höchsten Werte auf.

Kultivierungsversuche

Nach mindestens 14 Tagen der Kultivierung bei 4°C im Dunkeln zeigten alle Platten ein sichtbares Mikrowachstum. Die meisten Kulturen waren farblos bis eierschalenfarben, jedoch fanden sich auf allen Platten auch pigmentierte Kolonien (glänzende kreisförmige Kulturen in roter, oranger bzw. gelber Färbung, Abb. 4). Zudem zeigte sich sichtbares Wachstum von Pilzen, die aber nicht weiter untersucht wurden.

Biodiversität

Aus 12 Reinkulturen wurden 9 verschiedene 16S rDNA Sequenzen gewonnen, welche mittels „Classifier“ dem jeweiligen Phylum (Stamm) zugeordnet wurden (Tabelle 1). Vier Kulturen erwiesen sich als Proteobacteria (mit 4 unterschiedlichen Sequenzen aus den Kernen 1 und 2), vier als Actinobacteria (3 Sequenzen aus allen entnommenen Kernen) und vier – von denen drei aus den oberflächlichen Teilstücken stammten – als Cyanobacteria (2 Sequenzen aus allen Kernen). Von den vier Sequenzen der Proteobacteria, welche in

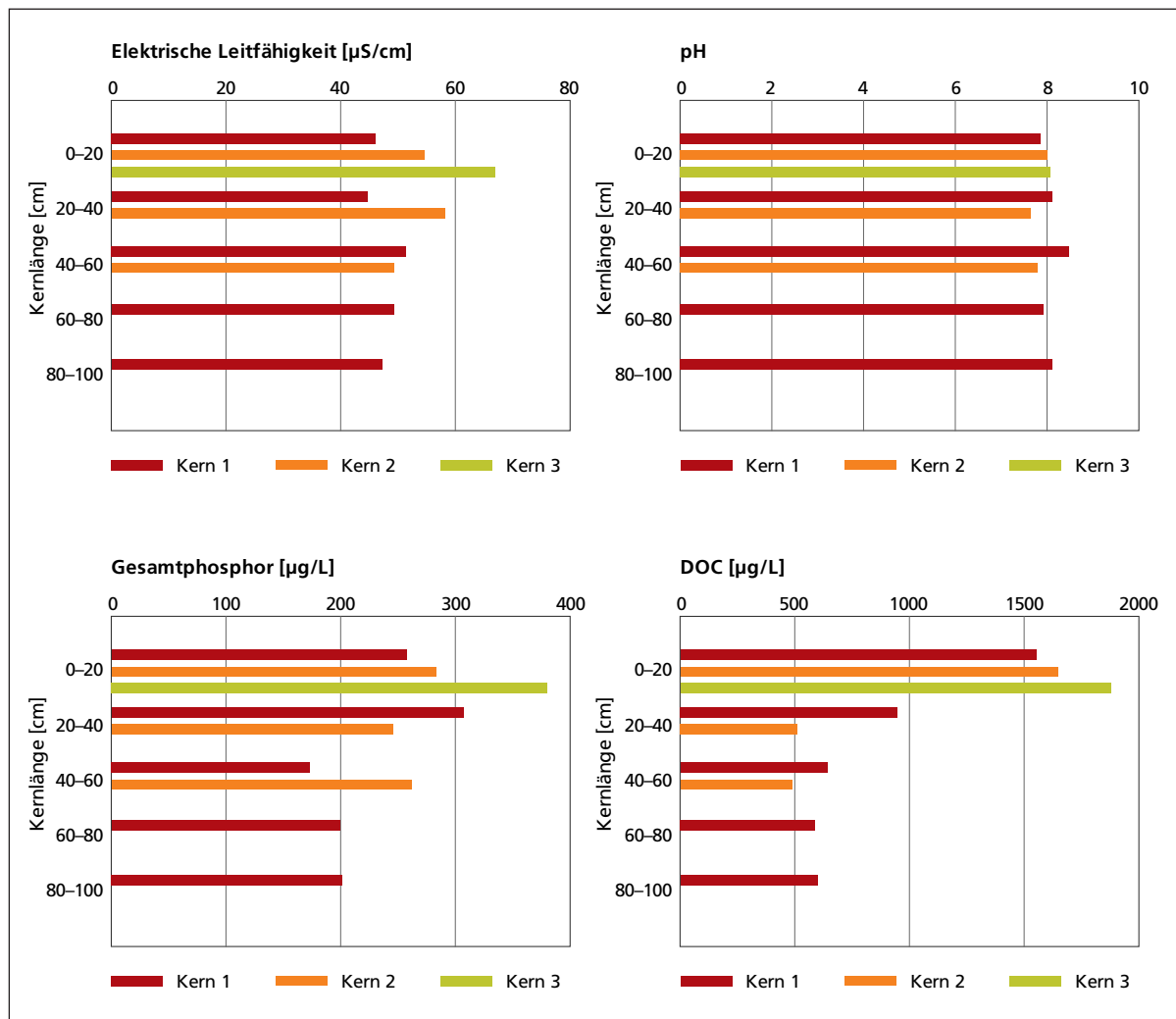


Abb. 3: Chemische Parameter der Eiskerne (elektrische Leitfähigkeit, pH, Gesamtphosphor (Ptot) sowie gelöster organischer Kohlenstoff (DOC).

Fig. 3: Chemical parameters of the ice core samples (electrical conductivity, pH, total phosphor (Ptot), as well as dissolved organic carbon (DOC).

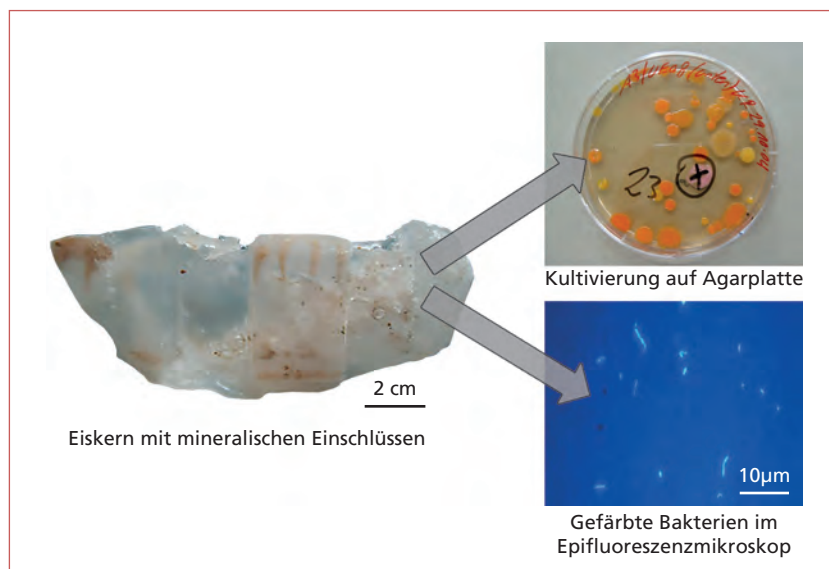


Abb. 4: Ein Eiskern mit feinkörnigen mineralischen Einschlüssen. Die Kultivierung auf Agarplatten zeigt das Wachstum von Kolonien mit Pigmenten (rechts oben). Quantifiziert wurden die gefärbten Bakterien mittels Epifluoreszenzmikroskopie (rechts unten).

Fig. 4: An ice core with fine grained mineral inclusions. Cultivation on agar plates showed the growth of colonies with pigments (top right panel). Quantification was performed using epifluorescence microscopy (lower right panel).

Phylum	Nächster Verwandter	Ähnlichkeit (%)	Isolationshabitat des nächsten Verwandten
Proteobacteria	Unkultiviertes Comamonadaceae Bakterium Klon GC12m-2-5	99	Lake Michigan
Proteobacteria	Unkultiviertes Bakterium Klon 145ds20 16S	99	20m flussabwärts von Feld mit Pferdedung, Cincinnati, USA
Proteobacteria	Unkultiviertes Bakterium Klon 1.52 aus Spitzbergen, Arctic lake 3	99	See, Arktis
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. PR3-5 16S	99	Boden, Ny Alesund, Spitzbergen
Actinobacteria	<i>Microcella putealis</i> Stamm CV2T	98	Alkalisches Grundwasser, Cabeco de Vide, Portugal
Actinobacteria	Firmicutes Stamm ikaite	98	Ikka Fjord
Actinobacteria	Unkultiviertes Bakterium Klon ANTLV1_D04 16S, Antarktis	98	Lake Vida Eisbedeckung, McMurdo Dry Valleys
Cyanobacteria	Unkultivierter phototropher Prokaryot, Klon RS 8-Bact35	99	Roter Schnee, global
Cyanobacteria	Unkultivierter Klon (Prokaryota)	99	Toolik See, Arktis

Tabelle 1: Systematische Stellung von Bakterien aus dem Eis der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle nach den Sequenzen der 16S rDNA (Spalte eins). Sequenz mit der höchsten Ähnlichkeit aus der GenBank-Datenbank (Spalte 2). Ausmaß der Ähnlichkeit (100% = völlige Übereinstimmung; Spalte 3). Habitat des nächsten Verwandten (Spalte 4; Dworkin et al., 2006).

Table 1: Systematics of the bacteria isolated from the ice of the Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle based on the sequences of the 16S rDNA (first column). Sequences with the highest degree of similarity from the GenBank database (second column). Degree of similarity (100% = complete match; third column). Habitat of the closest relative (fourth column; Dworkin et al., 2006).

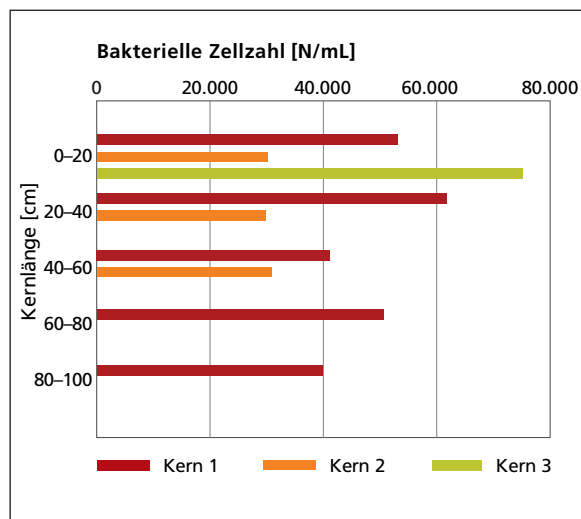


Abb. 5: Bakterielle Zellzahlen aus den Teilstücken der drei Eiskerne.

Fig. 5: Bacterial cell counts obtained on segments of the three ice cores.

α , β , γ , δ - sowie ϵ -Proteobakterien eingeteilt werden (Dworak et al., 2006), gehörten drei zu den Beta-proteobakterien (auf alle Kerne verteilt) und eine zu den Gammaproteobakterien (aus dem tiefsten Teilstück von Kern 1). Die detektierten Sequenzen konnten mit einer Ähnlichkeit von 98–99% Organismen

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle ist als Schauhöhle sicher eine Ausnahme unter den subterranean Eislebensräumen, weil Touristen im Schuhprofil oder

zugeordnet werden, welche zum Teil aus Habitaten mit generell tieferen Temperaturen stammen (siehe Tabelle 1).

Bakterielle Zellzahlen

Die höchste Dichte an heterotrophen Organismen ($7,51E4$ Zellen pro mL) wurde im Teilstück 0–20 cm des Kernes 3 (Abb. 5) ermittelt, die geringste ($2,98E4$ Zellen pro mL) in Kern 2 im unteren Teilstück. Die Dichte der autotrophen Organismen konnte nur in den Oberflächenstücken der Kerne bestimmt werden und schwankte von $1,3E2$ bis $3,1E2$ pro mL. Alle darunter liegenden Teilstücke wiesen keine Autotrophie auf. Die Zellen hatten das Erscheinungsbild von Coccen bzw. kurzen Stäbchen (Abb. 5) und waren mit einer Maximallänge von $1 \mu\text{m}$ sehr klein.

Bakterielle Kohlenstoffproduktion

Die niedrigste C-Produktion, errechnet aus der ^3H -Leucin-Inkorporation, wurde mit $9,80E-04 \mu\text{g C/L/h}$ im tiefsten Teilstück (80–100 cm) von Kern 1 festgestellt, die höchste mit $8,9E-3 \mu\text{g C/L/h}$ im Teilstück 0–20 cm von Kern 3 (Mittelwert $5,73E-3 \mu\text{g C/L/h}$, $\pm 2,78E-3 \mu\text{g C/L/h}$).

durch Berühren der Eisfläche eine große Menge allochthoner (d.h. ursprünglich ortsfremder) Mikroben eintragen. Manche dieser Arten können durch

physiologische und ökologische Eigenschaften oder Anpassungsleistungen in der Höhle florieren, andere drosseln ihren Metabolismus und überdauern als scheinotote Ruhestadien, während viele die Konkurrenz mit etablierten Arten verlieren und wieder verschwinden. Die Struktur und Funktion der ursprünglichen Gemeinschaft ändert sich auf jeden Fall.

Die Partikelverteilung in den einzelnen Kernen erwies sich als sehr variabel und führte sogar dazu, dass zwei Bohrungen aufgrund größerer Gesteinsbrocken nicht fortgeführt werden konnten. Der Einfluss von sichtbarem Gesteinsmaterial und der damit verbundenen Ionen im Eis spiegelt sich in der Leitfähigkeit wider. Die Werte liegen weit über jenen von Bohrkernen anderer Eishabitate, wobei die Oberflächenstücke eine besonders hohe Leitfähigkeit aufweisen. Dies steht sicher in Zusammenhang mit eingebrachtem Pflanzenmaterial an der Eisoberfläche, was sich in weiterer Folge auch auf den pH-Wert sowie den Gesamtphosphor- und DOC-Gehalt auswirkt. Bei allen drei Kernen sind diese Parameter erhöht. Der Gehalt an Gesamtphosphor ist bei diesen Kernen sogar ungewöhnlich hoch, wie sonst nur in Gebieten mit verstärktem Eintrag an Pflanzenresten. Der DOC-Gehalt ist vergleichbar mit Oberflächenkernen aus alpin-glazialen Gebieten oder aus Hochgebirgsseen (Gritsch, 2004); vermutlich liegt der Kohlenstoff eher in partikulärer Form vor.

Mit der unterschiedlichen Partikelverteilung im Eis geht eine äußerst variable Verteilung der Zellen einher. Bakterien heften sich gern an Partikel, von denen sie auch Nährstoffe beziehen; dies ist besonders gut an Kern Nr. 3 zu sehen, welcher an der Oberfläche stark von Partikeln bedeckt war. Durch die unregelmäßige Verklumpung mit den Partikeln sind solche Mikroorganismen mikroskopisch schwer quantifizierbar. Die Zellzahl der Bakterien entspricht durchwegs den Häufigkeiten aus Gletschereis, wobei der Trend zu erhöhten Zellzahlen in den obersten Schichten ein generelles Phänomen darstellt. Zum Teil ist dies auf die Verfügbarkeit von flüssigem Wasser an der Oberfläche zurückzuführen. In der Produktivität zeigt sich eine ähnliche, mit der Partikeldichte korrelierende Tendenz.

Unter Gletscherstaub oder Kryokonit versteht man windverfrachtetes organisches und anorganisches Feinmaterial auf der Gletscheroberfläche. Schmelzen sich diese dunklen Ansammlungen aufgrund der Absorption von Sonnenenergie in das Eis hinein, so entstehen Kryokonitlöcher, die hochaktive mikrobielle Gemeinschaften beherbergen (Anesio et al., 2009). Außerhalb dieser zylinderförmigen Vertiefungen nimmt die Produktivität im Eis oder in Schmelzkanäl-

chen rapide ab und bewegt sich in Größenordnungen wie im Eis der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle (Foreman et al., 2007). Das Höhleneis war zum Zeitpunkt der Beprobung ziemlich feucht, was sich positiv auf die Produktivität auswirkte.

Autotrophe Zellen, so auch die Cyanobakterien, finden sich ausschließlich in den oberflächennahen Teilstücken (0–20 cm). Cyanobakterien (früher als Blaualgen bezeichnet) wurden häufig aus alpinen, nord- und südpolaren Regionen isoliert, wo sie Matten und Biofilme am Grund von Seen, Teichen und Flüssen bilden (Jungblut et al., 2009). Oft dominieren sie die Biomasse und Produktivität eines Ökosystems. Cyanobakterien aus alpinen oder polaren Gegenden haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um den extremen Bedingungen entgegenwirken zu können (Vincent, 2009). Sie besitzen Pigmente zum Schutz vor UV-Strahlung, ein hocheffizientes System zum Einfangen von Licht, die Fähigkeit zur Speicherung von Nährstoffen und eine hohe Toleranz gegenüber Gefrier-Tau-Zyklen (Jungblut et al., 2009). Im Fall der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen aus der Umgebung eingeschwemmt bzw. mit Luftströmungen eingebracht worden sind, da innerhalb der Höhle durch die extrem geringe Lichtintensität (nur während Führungen, die mit Karbidhandlampen durchgeführt werden) eine aktive Photosynthese kaum möglich ist. Allerdings dringt bei Sonnenhochstand in den Sommermonaten ein sehr geringer Anteil von sichtbarem Licht durch den Schacht über dem *Eisdome* in das System ein, was vielleicht die Grundlage für Photosynthese bieten könnte. Der Nachweis von pigmentierten Kolonien aus einem nahezu lichtlosen Lebensraum lässt vermuten, dass diese Organismen zum Teil eingeschwemmt oder eingeweht wurden (vgl. Sattler et al., 2001). Manche autotrophe Organismen, die an der Eisoberfläche detektiert wurden, mögen aber mit der Lichtmenge der wenigen Lampen entlang des Führungsweges auskommen. Die „Lampenflora“ kann bekanntlich das Erscheinungsbild einer Schauhöhle erheblich stören (Mulec & Kosi, 2009). Das Vorhandensein von Pilzen im Eis der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle dürfte mit anthropogenem Eintrag und immer wieder auftretenden Holzresten zusammenhängen. Für manche Hefearten ist jedoch Eis und Schnee ein bevorzugter Lebensraum, auch wenn kein Substrat sichtbar ist (Butinar et al., 2007).

Kultivierungsversuche sind kritisch zu betrachten, weil sich aus Umweltproben nur ca. 1% aller Stämme kultivieren lassen (Amann et al., 1995). Für eine erste Annäherung an die Biodiversität wurde dieses Faktum jedoch in Kauf genommen. Im Höhleneis fanden sich

Arten, die für Eishabitate wie das Grönlandeis oder für Schneedecken charakteristisch sind (Alfreider et al., 1996; Miteva et al., 2003; Amato et al., 2006; Gonzales-Toril, 2009). Der Anteil der Actinobacteria in der Hundsalm Eis- und Tropfsteinhöhle beruht auf dem vermehrten Vorkommen eines unkultivierten Bakteriums, dessen nächster Verwandter aus dem Ikka Fjord in Grönland isoliert wurde. Kalktuff-Säulen im Ikka Fjord bieten einen stabilen Lebensraum mit tiefen Temperaturen und einem neutralen (außen) bis sehr alkalischen (10,4) pH-Wert im Inneren der Säulen. Aus diesen Kalktuffvorkommen wurden Bakterien der

Familie der Microbacteriaceae mittels 16S rRNA Analyse detektiert (Stougaard et al., 2002). Eine weitere, häufig isolierte Art aus dem Stamm der Actinobacteria ist *Microcella putealis*, ein gram-positives stäbchenförmiges Bakterium, welches keinerlei Fähigkeit zur Sporenbildung besitzt. Der optimale pH-Wert für diese Art, die bereits aus mehreren kalten Ökosystemen wie dem Eis des subglazialen Vostok Sees (Antarktis) isoliert wurde, liegt zwischen 8,5 und 9. Eine tiefergehende Interpretation dieser Daten ist jedoch erst nach einer ausführlicheren Analyse sinnvoll.

DANK

Die Autoren bedanken sich bei der Fa. D. Swarovski & Co. für die teilweise Förderung dieser Projektstudie. Die chemischen Analysen wurden von Josef Franzoi sowie Gry Larsen (Institut für Ökologie) durchgeführt.

Für kritische Hinweise danken wir P. Czech und für editorielle Verbesserungsvorschläge danken wir E. Christian sehr herzlich.

LITERATUR

- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glöckner, F.O., Wille, A. & Psenner, R. (1996): Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. – *Appl. Environm. Microbiol.*, 62: 2138–2144.
- Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. – *Microbiol. Revue*, 59: 143–169.
- Amato, P., Hennebelle, R., Magand, O., Sancelme, M., Delort, A., Barbante, C., Boutron, C. & Ferrari, C. (2006): Bacterial characterization of the snowcover at Spitzberg, Svalbard. – *FEMS Microbial Ecol.*, 59: 255–264.
- Anesio, A.M., Sattler, B., Hodson, A.J., Fritz, A. & Psenner, R. (2009): High microbial activities on glaciers: importance to the global cycle. – *Global Change Biology*, 15: 955–960.
- Baldini, J.U.L., Baldini, L.M., McDermott, F. & Clipson, N. (2006): Carbon dioxide sources, sinks, and spatial variability in shallow temperate zone caves: Evidence from Ballynamintra Cave, Ireland. – *J. Cave Karst Studies*, 68 (1): 4–11.
- Barr, T.C. (1967): Observations on the ecology of caves. – *The American Naturalist*, 101 (922): 475–492.
- Boston, B., Spilde, M., Northup, D., Soroka, D. & Kleina, L. (2001): Cave Biosignature Suites: Microbes, Minerals and Mars. – *Astrobiology*, 1: 25–55.
- Butinar, L., Spencer-Martins, I. & Gunde-Cimerman, N. (2007): Yeasts in high arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. – *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 277–289.
- Culver, D.C. & Pipan, T. (2009): *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. Oxford University Press, Oxford, 254 S.
- de Freitas, C., Littlejohn, R., Clarkson, T. & Kristament, S. (1982): Cave climate: Assessment of airflow and ventilation. – *Intern. J. Climatol.*, 2: 383–397.
- de Freitas, C., & Littlejohn, R. (1987): Cave climate: Assessment of heat and moisture exchange. – *Intern. J. Climatol.*, 7: 553–569.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt E. (Hrsg.) (2006): *The Prokaryotes, A Handbook of the Biology of Bacteria*. 7 Bände, 3. Aufl., Springer-Verlag, New York.
- Ek, C. & Gewalt, M. (1985): Carbon dioxide in cave atmospheres. New results in Belgium and comparison with some other countries. – *Earth Surface Proc. Landforms*, 10: 173–187.
- Foreman, C.F., Sattler, B., Mickuchi, J.A., Porazinska, D.L. & Prisco, J.C. (2007): Metabolic activity and diversity of cryoconites in the Taylor Valley, Antarctica. – *J. Geophys. Res.*, 112, G04S32, doi: 10.1029/2006JG000358.
- Gonzalez-Toril, E., Amils, R., Delmas, R.J., Petit, J.R., Komarek, J. & Elster, J. (2009): Bacterial diversity of autotrophic enriched cultures from remote, glacial Antarctic, Alpine and Andean aerosol, snow and soil samples. – *Biogeosciences*, 6: 33–44.
- Gritsch, C. (2004): *Mikrobielle Besiedelung der Eisdecke eines Hochgebirges während der Eislegungsphase*. – Unveröff. Diplomarbeit Universität Innsbruck, 97 S.
- Hébraud, M. & Potier, P. (1999): Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. – *J. Molecular Microbiol. Biotechnol.*, 1: 211–219.
- Hodson, A., Anesio, A.M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Prisco, J.C., Laybourn-Parry, J. & Sattler, B. (2007): Glacial ecosystems. – *Ecol. Monographs*, 78: 41–67.
- Jungblut, A.D., Lovejoy, C. & Vincent, W.F. (2009): Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. – *ISME*, 4: 191–202.

- Margesin, R., Schumann, P., Sprör C. & Gounot A.-M. (2004): *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. – Intern. J. System. Evol. Microbiol., 54: 2067–2072.
- Melim, L., Liescheidt, R., Northup, D., Spilde, M., Boston, P., & Queen, M. (2009): A Biosignature Suite from Cave Pool Precipitates, Cottonwood Cave, New Mexico. – *Astrobiology*, 9: 907–917.
- Michie, N. (1997): An Investigation of the Climate, Carbon Dioxide and Dust in Jenolan Caves, NSW. – PhD thesis, Department of Physical Geography, Macquarie University, 298 S. Online: http://speleogenesis.com/directory/karstbase/pdf/seka_pdf9950.pdf.
- Morita, R. (1975): Psychrophilic bacteria. – *Bacteriological Revue*, 39: 144–167.
- Miteva, V.I., Sheridan, P.P. & Brenchley, J.J. (2003): Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. – *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 202–213.
- Mulec, J. & Kosi, G. (2009): Lampenflora algae and methods of growth control. – *J. Cave Karst Studies*, 71: 109–115.
- Pavuzza, R. & Spötl, C. (2000): Neue Forschungsergebnisse aus der Hundalm-Eishöhle (1266/1). – *Höhlenkundl. Mitt. Landesvereins-Höhlenkunde in Tirol*, 51: 3–10.
- Porter, K.G. & Feig, Y.S. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. – *Limnol. Oceanogr.* 25(5): 943–948.
- Psenner, R. & Sattler, B. (1998): Life at the freezing point. – *Science*, 280: 2073–2074.
- Psenner, R., Wille, A., Priscu, J.C., Felip, M., Wagenbach, D. & Sattler, B. (2003): Low Temperature Environments and Biodiversity - In: *Extremophiles: Ice Ecosystems and Biodiversity*; In: *Knowledge for Sustainable Development. An Insight into the Encyclopedia of Life Support Systems, III*, 573–598, UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford.
- Reitschuler, C., Schwarzenauer, T. Lins, P., Wagner, A.O., Spötl, C. & Illmer, P. (2012): Zur Mikrobiologie von Bergmilch. – *Die Höhle*, 63(3): 3–17.
- Sattler, B., Puxbaum, H. & Psenner, R. (2001): Bacterial growth in supercooled cloud droplets. – *Geophys. Res. Letters*, 28(2): 239–242.
- Spötl, C. (2002): Die Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle. In: Tobitsch, R., Kogler, H. & Sieberer, W. (Red.): *Festschrift 50 Jahre Landesverein für Höhlenkunde in Tirol. Landesverein für Höhlenkunde in Tirol, Wörgl. – Höhlenkundl. Mitt. Landesvereins Höhlenkunde in Tirol*, 54: 43–51.
- Spötl, C. (2005): Datierungen von Tropfsteinen aus der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle. – *Höhlenkundl. Mitt. Landesvereins Höhlenkunde in Tirol*, 57: 5–9.
- Spötl, C. (2013): Die Entdeckungsgeschichte und der ursprüngliche Zustand der Hundsalz Eis- und Tropfsteinhöhle. – *Höhlenkundl. Mitt. Landesvereins Höhlenkunde in Tirol*, 65: 22–33.
- Stougaard, P., Jørgensen, E., Johnsen, M.G. & Hansen, O.C. (2002): Microbial diversity in ikaite tufa columns: an alkaline, cold ecological niche in Greenland. – *Environm. Microbiol.*, 8: 487–493.
- Takacs, C.D. & Priscu, J.C. (1998): Bacterioplankton dynamics in the McMurdo Dry Valley lakes: Production and biomass loss over four seasons. – *Microb. Ecol.*, 36: 239–250.
- Vogler, P. (1965): Probleme der Phosphoranalytik in der Limnologie und ein neues Verfahren zur Bestimmung von gelöstem Orthophosphat neben kondensierten Phosphaten und organischen Phosphorsäureestern. – *Intern. Revue Hydrobiol.*, 50: 33–48.
- Vincent, W.F. (2007): Cold tolerance in cyanobacteria and life in the cryosphere. In: Seckbach J. (Hrsg.) *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer Verlag, 287–301.