

Zur Mikrobiologie von Bergmilch

ZUSAMMENFASSUNG

Bergmilch sind plastische Mineralbildungen, die weltweit in Höhlen vorkommen. Diese Ablagerungen bestehen zum Großteil aus mikroskopisch kleinen Calcit-Kristallen und weisen einen sehr hohen Wassergehalt auf. Das Bemerkenswerte an Bergmilch ist jedoch die Assoziation mit Mikroorganismen, die eine direkte oder indirekte Rolle im Zuge der Entstehung einzunehmen scheinen. Die vorliegende Untersuchung, eine Kombination aus Lebendkultivierung und DNA-Analyse, nimmt erstmals für eine alpine Höhle dieses Phänomen in Österreich genauer unter die Lupe und versucht Fragen nach (I) der Herkunft mutmaßlich auftretender Mikroorganismen, (II) deren Versorgung mit Energie und Nährstoffen, (III) deren Rolle im Zuge der Bergmilch-Entstehung und (IV) deren Organisation auf den Grund zu gehen.

Die durchgeführten Untersuchungen in der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle (1266/1) in Tirol zeigen, dass eine komplexe, heterotroph-dominierte, psychrophile mikrobielle Gemeinschaft aus Archaea, Bacteria und Pilzen mit Bergmilch assoziiert ist und die Mikroorganismen in teils sehr hohen Individuenzahlen vorliegen. Mittels Lebendkultivierung konnten in allen 29 untersuchten Proben Mikroorganismen nachgewiesen werden, mit bis zu über einer Million Individuen (Bacteria) pro mL Bergmilch. Die auffallend hohe Anzahl pigmentierter Arten könnte ein Indiz für deren Herkunft aus einem lichtexponierten erdoberflächlichen Habitat sein. Molekularbiologische Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass insgesamt noch deutlich mehr Organismen dieses Habitat besiedeln als es der kulturtechnische Ansatz vermuten lässt. Es wurden in manchen Proben allein über eine Million Archaea pro mL Bergmilch detektiert.

Der Nachweis verschiedener organischer Säuren – zum Teil in bemerkenswert hohen Konzentrationen – ist ein Indiz für mikrobielle Aktivität und könnte auch einen Hinweis auf den Energie- und Nährstoff-Eintrag in dieses System geben.

ABSTRACT

Microbiology of moonmilk

Moonmilk is a plastic mineral formation, which can be found inside cave systems all around the world. These deposits mainly consist of microscopic calcite crystals and show a very high water content. However, the association of microorganisms is remarkable, which seem to play a crucial role in the formation process.

The present study applies a combination of culture-based methods and DNA analysis and is to our knowledge the first attempt to investigate this phenomenon in an Alpine cave, in Austria. Central questions include (i) the origin of the occurring microorganisms, (ii) their supply with energy and nutrients, (iii) their role in course of the formation of the deposits, and (iv) their structure and organization.

The investigations within the Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle in Tyrol revealed that a complex, heterotroph-dominated, psychrophilic microbial community, consisting of archaea, bacteria and fungi is associated with moonmilk, with partly high microbial abundances. Via living cultivation microorganisms could be proved in all 29 samples, with individual (bacterial) numbers of up to one million per ml moonmilk. The remarkable number of pigmented species could be an indication for the origin from a light-exposed surficial habitat. Molecular biological methods proved that even more organisms inhabit this habitat as

**Christoph Reitschuler
Thomas Schwarzenauer
Philipp Lins
Andreas O. Wagner**

Universität Innsbruck,
Institut für Mikrobiologie,
Technikerstr. 25, 6020 Innsbruck
Christoph.Reitschuler@uibk.ac.at

Christoph Spötl

Universität Innsbruck,
Institut für Geologie und Paläontologie,
Innrain 52, 6020 Innsbruck
Christoph.Spoetl@uibk.ac.at

Paul Illmer

Universität Innsbruck,
Institut für Mikrobiologie,
Technikerstr. 25, 6020 Innsbruck
Paul.Illmer@uibk.ac.at

Eingelangt: 30.4.2012
Angenommen: 23.5.2012

was suggested after the culture-based investigations. One million archaea per ml were detected in some samples. The detection of different organic acids – partially in appreciable

amounts – is an indication for biological activity and could also give a hint to the energy and nutrient input in this system.

EINLEITUNG

Bergmilch – eine besondere Sinterform in Höhlen

Bergmilch bezeichnet weiche Mineralbildungen (Sinter, Speläotheme) innerhalb von Höhlen, die auch unter den Begriffen Mondmilch (engl. moonmilk) bzw. im Volksmund als Nix bekannt sind. Diese Ablagerungen sind zumeist schneeweiß, können aber auch, je nach Verunreinigung mit nicht-karbonatischen Stoffen, in gelblich bis rötlich-braunen Ausprägungen vorliegen (Cañaveras et al., 2006; Frisia & Borsato, 2010). Die makroskopischen Erscheinungsformen von Bergmilch reichen von Überzügen von Höhlenwänden, -decken oder -böden bis zu stalagmiten- oder stalaktitenartigen Formationen. Bergmilch kann auch subaquatisch in kleinen Höhlenseen vorkommen; dort tritt sie oft in Form sogenannter „cottonballs“ (dt. Wattebälle) auf, die sich unter anderem in der kristallinen Ausprägung von der gewöhnlichen Bergmilch unterscheiden (Curry et al., 2009).

Der überwiegende Teil von Bergmilch besteht aus Calcit-Kristallen (CaCO_3). Daneben können auch andere Minerale, wie Aragonit, Hydromagnesit und/oder Gips, enthalten sein (Portillo & Gonzalez, 2011; Rooney et al., 2010). Der Wassergehalt variiert zwischen 40 und 96%, was die hohe Plastizität erklärt (Curry et al., 2009). Es sind jedoch auch harte, krustenartige bis hin zu pulverartigen Formen bekannt, die i.w. auf Dehydrierung, also Alterung, zurückzuführen sind. Mikroskopisch betrachtet setzt sich Bergmilch aus einem Netzwerk mikroskopisch feinsten Calcit-Kristallfasern (Richter et al., 2008), extrazellulärer organischer Polymere sowie einzelliger und mehrzellig-fädiger Mikroorganismen zusammen (Barton & Jurado, 2007; Cañaveras et al., 2006; Curry et al., 2009).

Die Beteiligung von Mikroorganismen an der Entstehung von Bergmilch wird zwar seit längerem vermutet und diskutiert, umfassendere mikro- und molekularbiologische Untersuchungen diesbezüglich wurden jedoch erst innerhalb des letzten Jahrzehnts unternommen. Derartige Forschungen fanden unter anderem in Irland (Rooney et al., 2010), Italien (Paoletti et al., 2011), Mexiko (Northup & Boston, 2005), Slowenien (Mulec, 2008), Spanien (Cañaveras et al., 2006; Cuezva et al., 2009; Gonzalez et al., 2006; Portillo & Gonzalez, 2010; Portillo & Gonzalez, 2011) und den USA (Curry

et al., 2009) statt, bis dato jedoch noch nicht in Österreich.

Entstehung eines Organominerals

Das Bemerkenswerte der weltweit anzutreffenden Bergmilch-Ablagerungen ist ihre häufige Assoziation mit Mikroorganismen (Rooney et al., 2010). Nach aktuellen Forschungen wird davon ausgegangen, dass die Organismen eine entscheidende Rolle im Zuge der Bergmilch-Bildung spielen (Cañaveras et al., 2006). Sind (Mikro-)Organismen direkt oder indirekt an der Bildung von Mineralien beteiligt, spricht man von Organomineralisation. Die genaue Funktion, die Mikroorganismen bei der Bergmilch-Bildung zukommt, ist jedoch nach wie vor nicht geklärt. Die plausibelsten Erklärungen sind, dass Mikroorganismen entweder direkt eine Ausfällung von Calcit, infolge metabolischer Aktivität bewirken (sog. biologisch induzierte Mineralisation), oder, dass es zur Kristallisation an mikrobiellen Oberflächen kommt (Cañaveras et al., 2006; Barton & Northup, 2007; Curry et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2011). Es ist davon auszugehen, dass Mikroorganismen einen wesentlichen, wenn nicht sogar den entscheidenden primären Beitrag zur Bildung der Calcit-Kristalle der Bergmilch leisten, jedoch eine sekundäre Vergrößerung dieser Ablagerungen auch durch abiotische Vorgänge vorangetrieben wird (Cañaveras et al., 2006; Rooney et al., 2010). Indizien, die Wissenschaftler zur Annahme führten, dass es zur Bergmilch-Bildung infolge mikrobieller Aktivität kommen könnte, waren unter anderem ein niedrigerer CO_2 -Partialdruck, ein niedrigeres Ca/Mg-Verhältnis und weniger Ca- und Hydrogencarbonationen – jeweils im Vergleich zu herkömmlichem Höhlen-Sickerwasser ohne Mikroorganismen (Cañaveras et al., 2006).

Ein mögliches Szenario, das die Bildung von Bergmilch beschreiben könnte, gliedert seine Entstehung in drei Abschnitte: die mikrobielle Kolonisation, der mikrostrukturelle Zusammenbruch und die Inkrustierung (Cañaveras et al., 2006; Portillo & Gonzalez, 2011). Dieses Modell sieht vor, dass eine mikrobielle Kolonisation von außerhalb der Höhle, am wahrscheinlichsten über Sickerwasser, ihren Ursprung nimmt. Auf gleiche Weise erfolgt auch der Eintrag organischer Nährstoffe in die üblicherweise oligotrophen (nährstoffarmen)

Höhlensysteme und gewährleistet so die Energieversorgung heterotropher Lebensformen (Cañaveras et al., 2006; Cuezva et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2011; Rooney et al., 2010). Diese nutzen ausschließlich organische Kohlenstoff-Quellen in ihrem Metabolismus (Madigan et al., 2003). Von Oligotrophie spricht man üblicherweise, wenn weniger als 2 mg an organischem Kohlenstoff pro Liter vorliegen. In Höhlen liegen durchschnittliche Werte im Bereich von 0,02 bis 0,5 mg pro Liter (Barton & Jurado, 2007), also deutlich im oligotrophen Bereich. In weiterer Folge bilden sich funktionelle Gemeinschaften mikrobieller Gruppen, sogenannte Biofilme. Im Zuge mikrobieller Aktivität, die eine Erhöhung des pH-Wertes auf über 8 zur Folge hat, kann es in Lösungen zur Übersättigung und in weiterer Folge zur Calcit-Kristallisation kommen (Barton & Northup, 2007; Cañaveras et al., 2006; Cuezva et al., 2009; Curry et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2010; Portillo & Gonzalez, 2011). Eine, wenn auch umstrittene Hypothese geht davon aus, dass hochspezialisierte Organismen in der Lage sind, aus dem Calcifizierungsprozess einen energetischen Nutzen zu ziehen (Barton & Northup, 2007). Im Prozess der CaCO_3 -Ausfällung spielen eine Fülle zusätzlicher Faktoren, wie die Entfernung inhibitorischer Ionen (Mg^{2+} , SO_4^{2-} und PO_4^{3-}), die Aktivität der Carbonat-Anhydrase – einem Enzym, welches die Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser zu Hydrogencarbonat und Protonen katalysiert – das Vorhandensein autotropher Organismen und Ca-Ausscheidungen aus Zellen eine entscheidende Rolle (Barton & Northup, 2007). Die im Laufe der Kristallisation zunehmenden mechanisch-biologischen Kräfte führen zum Zusammenbruch der faserförmigen Calcit-Kristalle. Es bildet sich im Laufe der Zeit eine dichte, dicke Mineralschicht mit hohem Wasserrückhaltepotential. Mit zunehmender Verdichtung und Bildung sekundärer Kristallstrukturen entsteht im Inneren der sich bildenden Bergmilch ein Mikrohabitat, welches durch eine deutliche Aktivitätsabnahme mit geringerem O_2 -Partialdruck und reduzierter Nährstoffverfügbarkeit gekennzeichnet ist (Cañaveras et al., 2006; Portillo & Gonzalez, 2011). Dabei stellt sich aus evolutionärer Sicht die Frage, inwieweit die eigeninduzierte Inkrustierung mit dem daraus resultierenden Tod der Organismen in Einklang gebracht werden kann (Barton & Northup, 2007; Northup et al., 2000; Portillo & Gonzalez, 2011).

Die Kristallausprägung von Bergmilch-Ablagerungen variiert von monokristallinen Stäbchen, deren Bildung vor allem auf filamentöse Mikroorganismen zurückgeführt wird, bis hin zu polykristallinen rhombischen Ketten (Cañaveras et al., 2006). Aufgrund der besseren Übereinstimmung der Durchmesser monokristalliner

Stäbchen und filamentöser Actinobacteria – einer artenreichen Abteilung innerhalb der Bacteria, deren Vertreter typische fädige, kettenartig aneinandergereihte Zellaggregate ausbilden (Madigan et al., 2003) – ist deren Beteiligung im Zuge der Kristallisation wahrscheinlicher als jene von Pilzen (Barton & Northup, 2007; Cañaveras et al., 2006; Curry et al., 2009).

Leben in Höhlen

Es ist anzunehmen, dass bis dato unentdeckte, einzigartige mikrobielle Gesellschaften und gänzlich neuartige Mikroorganismen in Höhlensystemen anzutreffen sind (Northup & Boston, 2005). Auch wenn man davon ausgeht, dass diese mikrobiellen Gemeinschaften von heterotrophen Organismen dominiert sein dürften (Cuezva et al., 2009; Curry et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2011), sind auto- und oligotrophe Mikroorganismen von besonderem Interesse, da derartige Organismen oft über raffinierte und hoch-spezialisierte Fähigkeiten zur Energiegewinnung verfügen. Unter anderem können sie schwer abbaubare aromatische Verbindungen verwerten und sind in die Kreisläufe gasförmiger Verbindungen [z. B. H_2 , N_2 , CO_2 und CH_4] und die Metalloxidation [vor allem von Fe^{2+} und Mn^{2+}] eingebunden (Barton, 2006; Barton & Jurado, 2007; Mulec, 2008; Northup et al., 2000). Daneben können heterotrophe Lebensformen durch den Eintrag organischer Substanz von außen oder basierend auf der Verwertung von Ausscheidungsprodukten und abgestorbener Organismen Fuß fassen (Barton & Jurado, 2007; Curry et al., 2009). Mikroorganismen sind zumeist über das gesamte Höhlensystem verbreitet und nicht allein auf Bergmilch beschränkt. Ihre Häufigkeit nimmt jedoch zumeist mit zunehmendem Abstand vom Eingang ab (Cuezva et al., 2009). Grundsätzlich können jedoch Diversitäten und Bewuchsdichten je nach Höhle und Standort erheblich variieren (Barton & Jurado, 2007; Rooney et al., 2010).

Indizien für Leben

Indizien für mikrobielle Aktivität innerhalb von Höhlen können Verfärbungen, Ausfällungen, Korrosionsphänomene oder strukturelle Veränderungen („Felsaufweichung“) am oder im Gestein sein (Northup et al., 2000). Der offensichtlichste Beleg für das Vorhandensein von Mikroben stellt jedoch das Auftreten von Kolonien und Biofilmen dar (Barton, 2006). Derartige mikrobielle Zusammenschlüsse wurden bislang makroskopisch primär über deren Farbe eingeteilt, die sich durch die Artenzusammensetzung und die damit verbundene variierende Ausbildung mikrobieller Stoffwechselprodukte und Pigmente ergibt. Untersuchun-

gen in der in Nordspanien gelegenen Altamira Höhle brachten zutage, dass weiße Biofilme zumeist einen basischen pH-Wert aufweisen, während graue durch einen weniger basischen und gelbe durch einen leicht sauren pH-Wert gekennzeichnet sind (Portillo & Gonzalez, 2010). Weiße und graue Biofilme werden aufgrund ihrer Basizität in Zusammenhang mit sekundären Mineralbildungen gebracht, wobei die grundlegende mikrobielle Zusammensetzung weißer Biofilme der von Bergmilch am ähnlichsten ist (Portillo & Gonzalez, 2010; Portillo & Gonzalez, 2011).

Der Zusammenschluss von Mikroorganismen in Biofilmen – gallertige Gebilde aus Mikroorganismen und extrazellulären organischen Polymeren – ist in natürlichen Habitaten keine Ausnahme sondern die Regel. Durch die enge Vergesellschaftung können Organismen mit unterschiedlichen Spezialisierungen und Fähigkeiten miteinander kooperieren und somit Leistungen erbringen, zu denen sie alleine nicht in der Lage wären (Hall-Stoodley et al., 2004). Das gilt speziell auch für auf den ersten Blick lebensfeindliche Habitate, wie dem Inneren einer Höhle (kalt, lichtlos, nährstoffarm). Zudem bieten Biofilme Schutz vor physikalischen und chemischen Belastungen (Hall-Stoodley et al., 2004). Zum Beispiel bewirken aerobe (sauerstoffabhängige) Mikroorganismen in den obersten Schichten des Biofilms eine Sauerstoffzehrung und ermöglichen dadurch anaeroben Arten, für die Sauerstoff größtenteils toxisch ist, in tieferen Schichten zu überleben. Das Auftreten von Organismen, die man an einem bestimmten Ort nicht vermuten würde, sollte daher dazu anregen, auch nach anderen, zunächst unpassend erscheinenden Lebensformen zu suchen. In einigen Höhlen konnte so z. B. in Biofilmen eine hohe Diversität an anaeroben (z. B. sulfatreduzierenden) Bakterien nachgewiesen werden (Cuezva et al., 2009). Es sind noch weitere bemerkenswerte Phänomene und Strukturen von Höhlen bekannt, die auf mikrobielle Aktivität zurückgeführt werden können. So ist auch das sogenannte „Höhlen-Silber“, fluoreszierende Wassertropfen, die in der Nähe von Höhleneingängen oftmals anzutreffen sind, auf mikrobielle Aktivität zurückzuführen (Mulec, 2008). In Höhlenseen lassen sich mitunter Sinterformen finden, die als „pool fingers“ bezeichnet werden, deren „U-loops“ (U-förmige Verbindungen) mittels rein anorganischen, geologischen Prozessen nicht erklärbar sind (Barton & Jurado, 2007; Northup et al., 2000; Meyer & Plan, 2010).

Herkunft der Mikroorganismen

Sickerwasser gilt als die wahrscheinlichste bzw. relevanteste Art und Weise, wie Mikroorganismen in Höhlensysteme eindringen können (Curry et al., 2009;

Rooney et al., 2010). Es ist belegt, dass einige bodenbewohnende Bakterien zur Calcit-Ausfällung in der Lage sind (Curry et al., 2009), was ein Anhaltspunkt für die Herkunft höhleninterner Bergmilch-Bewohner wäre. Daneben ist ein mikrobieller Input auch über Luftzirkulationen, in Verbindung mit mikroskopisch kleinen Wassertröpfchen (sog. Hydroaerosolen) und Adhäsions-Partikeln (Cuezva et al., 2009) vorstellbar (Mulec, 2008). Verschiedene Prozesse können dazu führen, dass Luft in die Höhle eindringt oder aus ihr herausgesogen wird – die Höhle „atmet“ (Barton & Jurado, 2007). Tiere, allen voran Insekten und Fledermäuse, können ebenfalls für den Eintrag von Mikroorganismen verantwortlich sein. Zudem ist auch ein anthropogener Eintrag nicht außer Acht zu lassen (Barton, 2006; Barton & Northup, 2007; Northup et al., 2000). Nicht allein der Eintrag durch den Menschen selbst hinterlässt Spuren, auch die Verwendung künstlicher Lichtquellen, die Körperwärme, sowie CO₂ und Wasserdampf der Atemluft und diverse Hinterlassenschaften können, im Speziellen in Schauhöhlen, eine artifizielle und einschneidende Veränderung der natürlichen mikrobiellen Flora nach sich ziehen (Barton & Jurado, 2007; Mulec, 2008; Northup et al., 2000).

Mikroflora der Bergmilch

Diversitätsstudien, die konkrete Angaben über Häufigkeiten und die mikrobielle Zusammensetzung von Bergmilch geben, sind nur spärlich vorhanden. Im Rahmen von Untersuchungen in der Ballynamintra Höhle in Irland konnten in den untersuchten Ablagerungen 4 bis 25 verschiedene Bakterienarten sowie 1 bis 6 Pilz-Spezies nachgewiesen werden (Rooney et al., 2010). Andere Studien bestimmten Zelldichten von lediglich hundert bis zu 10 Millionen Individuen pro g Bergmilch (Barton & Jurado, 2007; Curry et al., 2009; Mulec, 2008). Man beachte dabei, dass derart hohe Zellzahlen, wie sie üblicherweise in Böden anzutreffen sind, unter beinahe nährstofffreien Bedingungen erreicht wurden (Curry et al., 2009). Auch in anderen Studien wurden Werte zwischen einer Million und zehn Millionen Zellen pro cm³ (Northup et al., 2000) bzw. von bis zu 100 Millionen Zellen pro mL höhleninternem Biofilm gemessen (Paoletti et al., 2011).

Bis dato konnten in Bergmilch-Proben bakterielle Vertreter der Gruppen Actinobacteria (*Pseudonocardia*, *Propionibacterium*), Alphaproteobacteria (*Sphingomonas*, *Methylobacterium*), Betaproteobacteria (*Aquabacterium*), Gammaproteobacteria (*Pseudomonas*), Epsilonproteobacteria und Chloroflexi (Curry et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2011), sowie mesophile (d.h. mit einem optimalen Temperaturbereich von 20–40 °C) Euryarchaeota (Cañaveras et al., 2006; Nort-

hup & Boston, 2005) als auch psychrophile (d.h. optimaler Temperaturbereich unter 15 °C) Crenarchaeota nachgewiesen werden (Gonzalez et al., 2006). Eury- und Crenarchaeota sind Vertreter der Archaea, die neben Bacteria und Eukaryota (Pflanzen, Pilze und Tiere) eine der drei großen Domänen der Lebewesen darstellen. Das Fehlen eines Zellkern verbindet die Archaea mit den Bacteria in der Gruppe der Prokaryota und stellt sie den Zellkern-tragenden Eukaryota gegenüber (Madigan et al., 2003). Das Auftreten von Pilzen ist ebenfalls dokumentiert (Curry et al., 2009; Rooney et al., 2011), jedoch nicht in dem Umfang wie für Prokaryoten (Barton & Northup, 2007; Cañaveras et al., 2006). Durch die Ausbildung von Hyphen (schlauchförmige Zellkompartimente) sind Pilze (Barton & Northup, 2007; Curry et al., 2009), aber auch filamentöse Prokaryoten wie etwa Actinobacteria (Cañaveras et al., 2006; Curry et al., 2009), in der Lage, Verknüpfungsstränge innerhalb der Calcit-Kristalle der Bergmilch auszubilden.

Wie komplex mikrobielle Höhlenökosysteme und Bergmilch im Speziellen sein können, lässt sich anhand oben angeführter und weiterführender Studien erahnen (Portillo et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2011), die konkrete Angaben über Gattungs- und Artzusammensetzungen für die entsprechenden Höhlen und Habitate angeben. Vor kurzem wurde sogar ein mit Bergmilch assoziierter troglobiontischer (d.h. vollständig an das Höhlenleben angepasster) Käfer (*Cansiliella servadeii*) in einer italienischen Höhle entdeckt, der in diesem Habitat das letzte Glied der Nahrungspyramide zu sein scheint (Paoletti et al., 2011).

ZIELSETZUNG

Bergmilch ist ein weltweit anzutreffendes Phänomen (Rooney et al., 2010), das in allen Klimazonen und unterschiedlichen Meereshöhen vorkommt (Curry et al., 2007) und in einigen Ländern auch hinsichtlich der Assoziation von Organismen eingehender untersucht wurde. Alpine und insbesondere österreichische Höhlen wurden bezüglich der biologischen Komponente von Bergmilch bis jetzt jedoch erst wenig beachtet. Im

UNTERSUCHUNGSMETHODIK

Theoretischer Hintergrund – Kultivierung vs. Molekularbiologie

Die Geomikrobiologie, in die auch die Disziplin der mikrobiellen Höhlenkunde (Speläomikrobiologie) fällt, ist eine junge Wissenschaft, die sich in den 1990er

Schädlinge und Nützlinge

Mikroorganismen innerhalb von Höhlen haben vor allem dadurch die Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern auf sich gezogen, dass sie, wie im Fall der Altamira Höhle (Cañaveras et al., 2006; Cuezva et al., 2009; Gonzalez et al., 2006; Portillo & Gonzalez, 2010; Portillo & Gonzalez, 2011), jahrtausendealte Höhlenmalereien zu zerstören begannen (Barton, 2006). Mikroorganismen stellen jedoch nicht zwangsläufig eine Gefahr dar, denn es könnten bislang noch unentdeckte oder wenig untersuchte Höhlenbewohner in Zukunft auch positive Anwendungen finden. Anwendungsfelder ergeben sich etwa im Bereich der Bioremediation (*in situ* Dekontamination unerwünschter organischer Verbindungen), der Pharmaindustrie, durch Bildung medizinisch nutzbarer Substanzen (z. B. Antibiotika), oder in der chemischen Industrie, durch Anwendung hoch-spezialisierter Stoffwechsellösungen (Barton, 2006). Zurzeit sind diesbezüglich jedoch erst wenige Informationen verfügbar. Die Fähigkeit gewisser Bergmilchbewohnender Mikroorganismen zur Calcit-Ausfällung wurde im Labor auf Kulturmedien bestätigt (Cañaveras et al., 2006; Curry et al., 2009). Eisen- als auch Mangan-oxidierende Bacteria verfügen über das Potential zur Lösung von Kalkstein und sind für Höhlensysteme, in denen diese Metalle (Fe²⁺ und Mn²⁺) vorkommen, beschrieben (Northup & Boston, 2005). Auch Pilze sind in der Lage, über Ausscheidung diverser Stoffwechselprodukte, wie z. B. organischer Säuren, Minerale zu lösen bzw. zu fällen, sind jedoch immer auf die Zufuhr organischer Nährstoffe angewiesen (Rooney et al., 2010).

Zuge einer Kooperation zweier Arbeitsgruppen an der Universität Innsbruck wurden erstmals das Vorkommen von Mikroorganismen und deren Bedeutung für die Bergmilch-Ablagerungen in der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle untersucht. In der vorliegenden Studie wurde versucht, mittels einer Kombination von Kulturtechnik und DNA-Analyse den mikrobiellen Vorgängen rund um das Phänomen Bergmilch näher kommen.

Jahren zu formieren begann (Barton & Jurado, 2007; Barton & Northup, 2007) und die steigende Zahl an Publikationen weist auf ein wachsendes Interesse in diesem Bereich hin. Nicht zuletzt deswegen, weil durch die Entdeckung neuer Arten bzw. neuer biochemischer Prozesse in Bereichen wie Bergbau, Recycling,

Biotechnologie oder in bislang noch nicht angedachten Sparten, ein unmittelbarer Nutzen für den Menschen resultieren könnte. Da jedoch vermutlich nicht alle LeserInnen der HÖHLE intensiv mit mikrobiologischen Methoden vertraut sind, mögen an dieser Stelle einige allgemeine Erklärungen nützlich sein. Um den Mikroorganismen in der Bergmilch auf die Spur zu kommen und herauszufinden, um welche Organismen es sich im Speziellen handelt, wurde in früheren Untersuchungen vorwiegend versucht, diese zu kultivieren. Die besten Ausbeuten (höchsten Keimzahlen) lieferten dabei Medien mit definierter Zusammensetzung und geringer Nährstoffkonzentration, sofern sie mit Wasser und mineralischen Partikeln aus der entsprechenden Höhle versetzt waren (Curry et al., 2009; Northup & Boston, 2005). Da es sich bei Bergmilch um ein oligotrophes Habitat handelt, erscheint die Lebend-Anzucht auf nährstoffreichen Medien wenig sinnvoll (Barton, 2006; Barton & Jurado, 2007), da hier vorab eine Selektion sogenannter r-Strategen (Organismen, die bei guter Nährstoffverfügbarkeit mit hohen Wachstumsraten reagieren können) erfolgt. Organismen, die mit einem Überangebot an Nährstoffen nicht zurechtkommen, niedrige Wachstumsraten aufweisen oder einem zu hohen osmotischen Stress mit damit zusammenhängendem Wasserverlust ausgesetzt sind (Barton, 2006), werden dabei übersehen. So käme es zur bevorzugten Anzucht nicht repräsentativer Vertreter der mikrobiellen Gemeinschaft und somit zu einer Fehleinschätzung der tatsächlichen Artenzusammensetzung (Rooney et al., 2010).

Der große Vorteil der Kultivierung besteht darin, dass theoretisch bereits eine einzelne Zelle zur Detektion ausreicht, während für die meisten molekularbiologischen Analysen mehr DNA als jene aus einer einzelnen Zelle erforderlich ist (Wagner et al., 2009). Des Weiteren besteht bei erfolgreicher Anzucht von Reinkulturen die Möglichkeit, diese Organismen weiterführend zu untersuchen und physiologisch zu charakterisieren (Barton & Jurado, 2007; Curry et al., 2009). Ein erhebliches Problem bei der Kultivierung besteht darin, dass von vornherein nicht klar ist, welche Bedingungen (allen voran Nährstoffzusammensetzung und pH-Wert) für die einzelnen Organismen in der Bergmilch notwendig sind. Es ist daher auszuschließen, dass mit der Lebendkultivierung ein Gesamtüberblick erzielt werden kann. Bergmilch zeichnet sich, wie Biofilme allgemein, durch ein ausgeprägtes Tiefenprofil aus. Das heißt, dass Gradienten unterschiedlicher Umweltparameter vorliegen und sich verschiedene Mikrohabitate ausbilden (Cañaveras et al., 2006; Curry et al., 2009). Es ist also bereits bei der Probenahme Vorsicht geboten, möchte man einzelne Schich-

ten separat charakterisieren. Grundsätzlich wird angenommen, dass weniger als 1% aller auf der Erde vorkommenden Mikroorganismen (zurzeit) kultivierbar sind (Northup & Boston, 2005). Durch eine ausschließliche Erfassung des mikrobiellen Spektrums mittels Kultivierung, ist somit eine deutliche Unterschätzung der Artenvielfalt wahrscheinlich (Rooney et al., 2010). Bei Analysen der mikrobiellen Zusammensetzung von Umweltproben haben sich in den letzten Jahrzehnten immer mehr molekularbiologische Methoden etabliert. Dieser vorwiegend auf DNA-basierte Detektion und Analyse von Mikroorganismen ausgerichtete Untersuchungsansatz erlaubt es, im Gegensatz zur Lebend-Kultivierung, nicht-kultivierbare und auch bereits abgestorbene Organismen nachzuweisen (Northup & Boston, 2005; Rooney et al., 2010). Der erste Schritt hierbei stellt die DNA-Extraktion dar, bei der potentiell die gesamte vorhandene DNA (eukaryotisch und prokaryotisch) isoliert wird. In den folgenden Schritten wird die DNA qualitativ und quantitativ untersucht. In einem weiteren Schritt wird mit Hilfe von spezifischen Sonden, sogenannten Primern, in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – einem Verfahren zur Detektion und Vervielfältigung definierter DNA – nachgewiesen, ob die Nukleinsäuren von bestimmten Zielorganismen vorhanden ist. Neben einer herkömmlichen PCR, die primär eine qualitative Aussage zulässt (ist ein Zielorganismus vorhanden oder nicht), besteht die Möglichkeit, mittels quantitativer PCR (qPCR) auch die Anzahl der vorhandenen Organismen zu bestimmen. Um einen Überblick über die ungefähre Artenvielfalt und –zusammensetzung zu bekommen, können in einem weiteren Verfahren PCR-positiv Proben mittels DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysiert werden. Bei der DGGE handelt es sich um ein elektrophoretisches Trennverfahren, bei dem an ein mit DNA beladenes Gel eine Spannung angelegt wird, wodurch die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Gesamtladung im elektrischen Feld wandern. Bedingt durch unterschiedliche Basenzusammensetzungen wandern sich unterscheidende Moleküle verschieden weit.

Ein in vielen molekularbiologischen Untersuchungen abschließendes Verfahren stellt die DNA-Sequenzierung einzelner isolierter Reinkulturen dar. Der Sequenzierung geht ein aufwändiger Prozess der DNA-Extraktion, -Vervielfältigung, -Reinigung und -Quantifizierung voraus, um schlussendlich im Idealfall über die nachgewiesene Basenabfolge einen konkreten Organismus ansprechen zu können.

Beide Herangehensweisen, die kulturtechnische und die molekularbiologische, haben Vor- und Nachteile, deren Limitierungen jedoch in kombinier-

ter Ausführung weitgehend kompensiert werden können.

Angewandte Methodik

Für die Kultivierung von Mikroorganismen mittels des Kochschen Plattengussverfahrens kamen zum überwiegenden Teil die Medien „B4“, „R2A“, „MEA“, „Moonmilk“ und „Hyphomicrobium“ zum Einsatz, die den Arbeiten von Curry et al. (2009), Mulec et al. (2002) und Portillo et al. (2009) entnommen und zum Teil modifiziert bzw. in stärker verdünnten Varianten angewandt wurden. Diese Medien beinhalteten u.a. komplexe C- und N-Quellen, wie Hefeextrakt, Malzextrakt oder Pepton, definierte C- und N-Quellen, wie Glucose, Na-Acetat, Na-Pyruvat, Harnstoff und Ammonium-Acetat und weitere

Wachstumszusätze, wie CaCO_3 , CaCl_2 und MgSO_4 . Die DNA-Extraktion wurde mittels des Kits NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Quantifizierung genomischer DNA erfolgte einerseits mittels NanoDrop 2000c (ThermoScientific), andererseits PicoGreen-basiert auf einem zenYth 3100 (anthos). PCRs wurden auf einem FlexCycler (Analytik Jena) durchgeführt, anschließende Gelelektrophoresen auf einer Mupid-exu Einheit (ADVANCE). Die DGGE-Analysen wurden mittels einer IngenyphorU-Einheit (Ingeny) durchgeführt. Quantitative Untersuchungen (qPCR) erfolgten auf einem RotorGene 6000 Cyclyer der Firma Corbett.

Die HPLC-Untersuchungen wurden auf einem Shimadzu LC2010 System (Shimadzu) entsprechend den Standardmethoden für VFA-Analytik mit einer Aminex HPX-87H (Biorad) durchgeführt.

DIE HUNDALM EIS- UND TROPFSTEINHÖHLE (1266/1)

Westösterreichs einzige öffentlich zugängliche, eisführende Höhle liegt im Gebiet der Hundalm nördlich von Wörgl im Unterinntal (Gemeinde Angerberg). Sie ist schachtförmig entlang einer Störung im Wettersteinkalk angelegt (Abb. 1) und wurde erstmals im Jahre 1921 von Höhlenforschern befahren. Der Eingang befindet sich in 1520 m Seehöhe neben der Viktor-Büchel-Forscherhütte in einem lockeren Nadelwald. Das obere Stockwerk der Höhle ist touristisch erschlossen und wurde 1967 als Schauhöhle eröffnet. Mehrere Bereiche in diesem Teil der Höhle führen Bodeneis, sowie Eisstalaktiten, -stalagmiten, und -säulen, die jedoch im Laufe des Jahres wieder teilweise abschmelzen. Das Bodeneis ist lokal mehrere Meter mächtig. An etlichen Stellen der Höhle finden sich inaktive Wandsinter in unterschiedlichen Stadien der Zerstörung. Nur im südlichsten Teil (Tropfsteinhalle) gibt es bescheidene Anzeichen für rezente Sinterbildung in Form von Sinterröhrchen und kleinen hellen Wandsinterbereichen. Die Lufttemperatur im oberen Stockwerk variiert je nach Standort und zeigt im Eisbereich Temperaturminima von bis zu ca. $-8\text{ }^\circ\text{C}$ im Hochwinter und Werte sehr nahe am Gefrierpunkt während der warmen Jahreszeit (Spötl & Obleitner, 2008; Spötl, 2011). Im südlichen, eisfreien Abschnitt der Höhle klettern die Sommer- und Herbsttemperaturen auf ca. $1\text{ }^\circ\text{C}$.

1984 wurde ein wetterführender Spalt künstlich erweitert und der Zugang zu einem tieferen Stockwerk gefunden. Dieser sog. Neuteil ist eisfrei und weist eine Lufttemperatur von $4,2 \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ (Messreihe 1998-2011)

auf. Der Verbindungsschluf hinunter in den Neuteil wird durch eine versperrbare Luke bestehend aus einer ca. 5 cm dicken Dämmplatte verschlossen. Sinterbildungen sind in diesem tieferen Stockwerk nicht selten. Die meisten Wandsinter sind jedoch inaktiv, ebenso die wenigen Stalagmiten (wie auch Uran-Thorium-Altersdaten belegen). Aktive Sinterbildung beschränkt sich zum einen auf wenige Sinterröhrchen und Stalaktiten im südlichen Teil (Jugendgang). Zum anderen finden sich an mehreren Stellen, besonders aber am N-Ende des Neuteiles, schneeweiße Bildungen von Bergmilch, bevorzugt an der Höhlenwand (Abb. 2A), seltener am Boden von kleinen Seitengängen und als Überzüge auf inaktiven braunen Tropfsteinegebildet. Zudem tritt Bergmilch auch in einer subaquatischen Form als extrem weiche Masse (an „cottonballs“ erinnernd) in einem seichten Teich auf (Abb. 2B) und erreicht dort eine geschätzte Mächtigkeit von mindestens einem halben Meter.

Im Oktober 2010 sowie Juni 2011 wurden von 10 bzw. 13 Bergmilchablagerungen im tieferen, eisfreien Stockwerk der Höhle insgesamt 27 Proben aus meist oberflächlichen Bereichen (0 – 1 cm Tiefe) entnommen (Abb. 1 zeigt die Lokalität der Beprobung). Einzelne Proben wurden bis in Schichten von etwa 7 cm entnommen. Zusätzlich wurden zwei Wasserproben genommen, eine Bergmilch-Tropfwasserprobe und eine aus einem kleinen Höhlensee mit subaquatischer Bergmilch. Bei der Probennahme wurde sowohl darauf geachtet, weder allzu invasiven Veränderungen zu hinterlassen, noch Kontaminationen von außer-

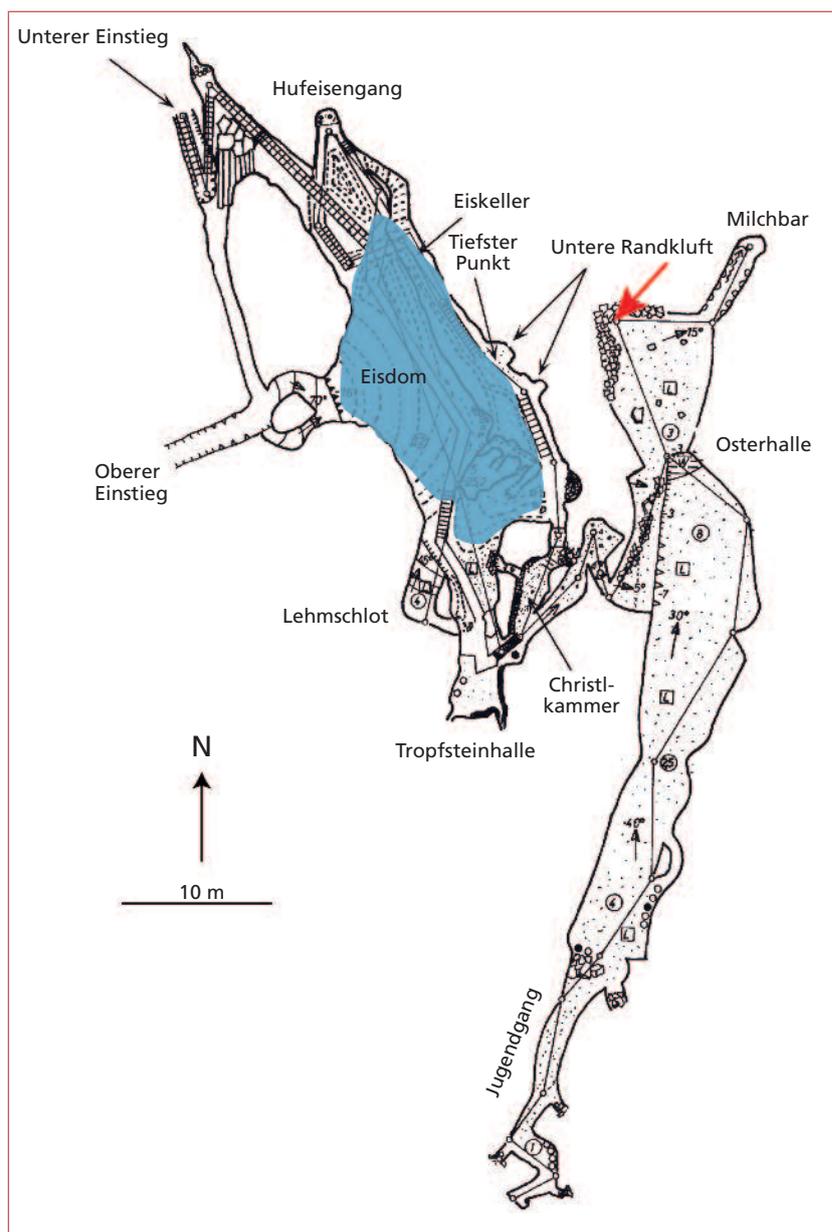


Abb. 1: Grundriss der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle. Das obere, touristisch erschlossene Stockwerk enthält einen Eisbereich (blau) und ist durch einen engen Gang mit dem erst 1984 entdeckten tieferen Stockwerk (rechts) verbunden, in dem aktive Bergmilch-Vorkommen häufig sind. Der rote Pfeil markiert den beprobten Bereich.

Fig. 1: Plan view of the Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle. The upper level of the cave (a show cave) contains perennial ice (blue) and is connected via a narrow passage with the lower level (on the right side), which was discovered only in 1984 and in which moonmilk deposits are common. The sample location is marked by a red arrow.

halb der Höhle – soweit möglich – mitzuführen. Da die Proben unverfälscht aus der Höhle ins Labor gebracht werden sollten, wurden alle hierzu notwendigen Utensilien sterilisiert oder vor Ort keimfrei

gemacht (aseptische Probenahme, s. Abb. 3A). Die Proben wurden anschließend gekühlt ins Labor gebracht und dort bis zur Untersuchung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

ERGEBNISSE

Mikrobiologischer und kulturtechnischer Ansatz

Die makroskopische Struktur der verschiedenen untersuchten Bergmilchproben variierte zwischen glatten, faserigen bis gekörnten und knolligen Ausprägungen. Die Färbung der Proben reichte von einem

reinen Weiß über ein helles Grau bis hin zu einem rötlichen Braun. Mikroskopisch ist die stäbchenförmige Morphologie der Calcit-Fasern deutlich erkennbar (Abb. 3 B & C). Vereinzelt konnten bereits bei der ersten mikroskopischen Untersuchung durch Geißeln bewegliche, ovale und stäbchenförmige Mikroorganismen beobachtet werden.



Abb. 2: Bergmilch-Ablagerungen an der Decke (A) und in einem kleinen Teich (B) im eisfreien Neuteil der Hundalm-Eis- und Tropfsteinhöhle. Bildbreite ca. 1,5 m (A) bzw. 2,5 m (B).

Fig. 2: Moonmilk deposits on the ceiling (A) and in a small pool (B) in the deeper, ice-free part of the Hundalm-Eis- und Tropfsteinhöhle. Widths of images ca. 1.5 m (A) and 2.5 m (B), respectively.



Abb. 3 A: Aseptische Probenentnahme einer Bergmilchablagerung (Abflammen der Spatel erfolgte mit 96%igem Ethanol vor und nach jeder Probennahme). Abb. 3 B & C: Mikroskopische Aufnahme der Bergmilch bei unterschiedlicher Vergrößerungen; die längsten nadelförmigen Calcit-Kristalle haben eine Länge von ca. 35 μ m.

Fig. 3 A: Aseptic sampling of a moonmilk deposit (flame treatment of the spatula was carried out with 96 % ethanol before and after sampling). Fig. 3 B & C: Photomicrograph of moonmilk at different magnifications; the longest needle-shaped calcite crystals are around 35 μ m in length.

Um umfassende Aussagen über das Vorhandensein und die Zusammensetzung der mit Bergmilch assoziierten Mikroorganismen treffen zu können, wurden sowohl kulturtechnische als auch molekularbiologische Methoden angewandt. Da von vornherein nicht klar war, ob und unter welchen Bedingungen Mikroorganismen aus diesem Habitat im Labor kultivierbar sein würden und Informationen in der Literatur nur spärlich Aufschluss über eine allgemein gültige Herangehensweise lieferten, mussten zu Beginn der Kultivierung eine Vielzahl verschiedener Nährmedien getestet werden. Die Jahresdurchschnittstemperatur in der Höhle beträgt im eisfreien Bereich $4,2 \pm 0,1^\circ \text{C}$ (s.o.). Da befürchtet wurde, dass

eine Inkubation (Bebrütung) bei dieser Temperatur unter Umständen Wochen bis Monate in Anspruch nehmen könnte, wurden die Kulturansätze nicht nur bei den niedrigen Temperaturen 0 und 4°C sondern auch bei 10 und 25°C inkubiert.

Abbildung 4 stellt exemplarisch und unvollständig einige Mikroorganismenkulturen dar, die im Zuge der zweiten Bergmilch Probennahme isoliert wurden. Hierzu wurden insgesamt sieben verschiedene Medien (in bis zu vier unterschiedlichen Varianten) ausgetestet, die sich sowohl hinsichtlich der Gehalte an Kohlenstoff, Stickstoff, Calcium und anderen Elementen sowie hinsichtlich des pH-Werts unterschieden.

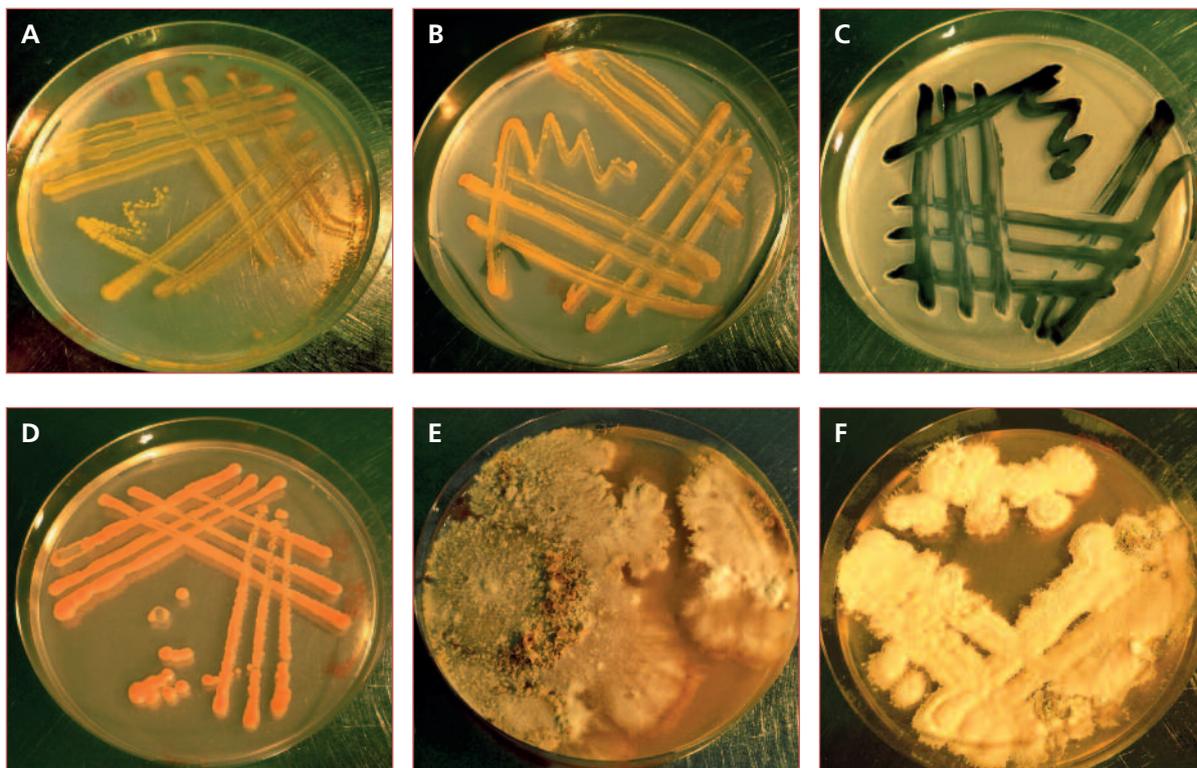


Abb. 4: Reinkulturen von Isolaten aus verschiedenen Bergmilch-Proben auf Nährmedien – optimiert zur Anzucht oligotropher Mikroorganismen; A – D: Bacteria, E und F: Pilze. Auffallend ist das häufige Vorkommen teils stark pigmentierter Mikroorganismen, was in Anbetracht der Lebensweise in totaler Dunkelheit bemerkenswert ist.

Fig. 4: Pure cultures from different moonmilk samples on complex media – optimized for cultivation of oligotrophic microorganisms; A – D: bacteria, E and F: fungi. Considering the total absence of light within the cave, the abundance of strongly pigmented microbes is remarkable.

Nach mehrwöchigen Untersuchungen zeigten sich bereits eindeutige Ergebnisse:

- Mikroorganismen konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Die Keimzahlen variierten dabei erheblich: Einige hundert bis zu über einer Million keimfähiger Organismen wurden pro mL Bergmilch nachgewiesen. Derartig hohe Keimzahlen bestätigen Ergebnisse von vergleichbaren Studien (Barton & Jurado, 2007; Curry et al., 2009; Mulec, 2008; Northup et al., 2000; Paoletti et al., 2011).
- Speziell optimierte Medien (deutlich geringere Nährstoffkonzentrationen als für herkömmliche Mikroorganismen üblich, CaCO_3 und Ammoniumacetat als wichtige Zusatzstoffe) lieferten die höchsten Keimzahlen und die größte mikrobielle Diversität. Diese Ergebnisse wurden auf Basis theoretischer Überlegungen angenommen und somit bestätigt.
- Wachstum konnte bei 25, 10, 4 und sogar bei 0 °C nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Mikroorganismen auch bei sehr niedrigen Temperaturen erstaunlich schnelles Wachstum. Fortführende, stichprobenartige Tests ergaben, dass ca. 30 °C die obere Grenze für das Wachstum der isolierten Mikroorga-

nismen darstellt, was im Einklang mit der psychrophilen und psychrotoleranten Lebensweise der Organismen steht. Die Keimzahlen scheinen bei den unterschiedlichen Temperaturen für die einzelnen Proben in etwa gleich zu sein. Daraus kann man schließen, dass es sich bezüglich Temperatur um eine relativ homogene Gemeinschaft mit definierter Obergrenze handelt.

- Die Zugabe von CaCO_3 zum Medium scheint für hohe Keimzahlen besonders ausschlaggebend zu sein. Unklar bleibt allerdings vorerst die Frage, ob CaCO_3 per se für diesen positiven Effekt verantwortlich ist, oder der durch CaCO_3 in einem hohen Bereich gepufferte pH-Wert.
- Ein erstaunlich hoher Anteil an pigmentierten Mikroorganismen (gelb – rot – blau – schwarz) konnte aus Bergmilch-Proben isoliert werden (Abb.4). Dies ist deshalb erstaunlich, da eine Pigmentierung oft in Verbindung mit einer Anpassung an hohe Lichtintensitäten gebracht wird. Der eisfreie Bereich der Höhle ist jedoch völlig lichtlos. Eine mögliche Erklärung könnte allerdings ein epigäischer Ursprung der Mikroorganismen sein.

- Während die Wasserprobe aus dem Höhlen-Pool weitaus geringere Keimzahlen lieferte als es die Moonmilk-Proben taten, lagen die Keimzahlen der Tropfwasserprobe unter dem Detektionslimit. Genauere Untersuchungen hierzu sind jedoch noch ausständig.

Molekularbiologischer Ansatz

In einem weiteren Schritt wurde versucht, Reinkulturen zu isolieren, um detailliertere Informationen zu erhalten und besonders interessante Arten genauer zu beschreiben. Von den knapp 200 isolierten Organismen konnte bislang allerdings erst ein Bruchteil eingehender untersucht werden. Mittels molekularbiologischer, DNA-basierter Untersuchungen ist es hingegen möglich, unabhängig von der Kultivierbarkeit der Organismen qualitative und quantitative Aussagen über ein Artenspektrum zu treffen.

Am Beginn jeder molekularbiologischen Untersuchung steht wie auch im vorliegenden Fall die Extraktion der DNA. Hierbei gestaltete sich die Extraktion allerdings wegen der extrem hohen CaCO_3 -Konzentrationen der Proben als sehr schwierig – ein Problem, das durch zusätzliche methodische Adaptierungen schlussendlich aber zufriedenstellend gelöst werden konnte. Die gereinigte DNA wurde im Anschluss mittels Gelelektrophorese (GE, ermöglicht die Trennung und Visualisierung doppelsträngiger DNA unterschiedlicher Größe), spektrophotometrischer (ND, NanoDrop) und fluorospektrometrischer (PG, PicoGreen) Analytik hinsichtlich Quantität und Reinheitsgehalt untersucht. Während mittels GE keine DNA nachweisbar war, konnte mittels sensitiverer Verfahren (PG und ND) in allen Proben DNA detektiert werden. Manche Messungen bewegten sich zwar am Detektionslimit, in anderen Proben waren hingegen beachtliche DNA-Konzentrationen nachweisbar. Darauf basierende Berechnungen zur groben Abschätzung der Gesamtorganismenzahl ergaben dementsprechend zum Teil erstaunliche Organismendichten von bis zu zehn Millionen pro mL Bergmilch, was sich durchaus mit Ergebnissen aus den kulturtechnischen Ansätzen deckt. In den nachfolgenden Schritten wurde mit spezifischen Primern, in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht, ob Archaea, Bacteria und Pilze in den Bergmilch-Proben vorhanden sind. Bisher konnten in 12 von insgesamt 29 Proben eindeutig Archaea und Bacteria nachgewiesen werden. Weitere spezifische Untersuchungen hierzu und Untersuchungen von Pilzen sind noch ausständig.

Mittels quantitativer PCR (qPCR) wurde in einem ersten Ansatz für die Probennahme vom Oktober 2010

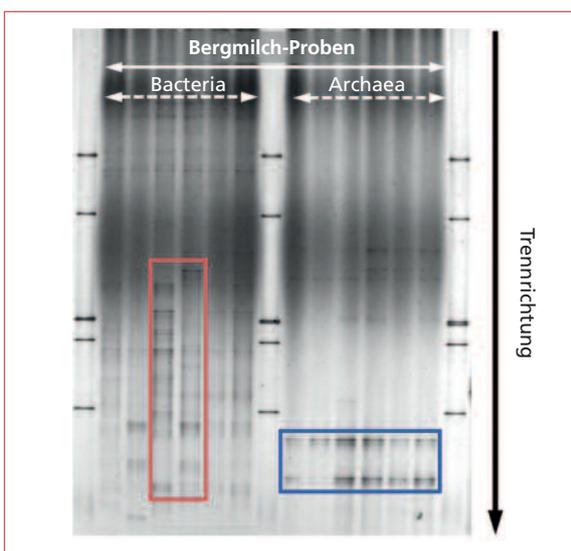


Abb. 5: DGGE ausgewählter Bergmilch-Proben. Bei der DGGE-Analyse wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle je nach ihrer artspezifischen Zusammensetzung unterschiedlich weit und sind dadurch unterscheidbar. Klar ersichtlich sind die teils stark variierenden Bandenmuster der einzelnen Proben. Die helleren Spalten im Zentrum und an den Seiten mit den regelmäßigen Bandenmustern stellen lediglich Orientierungsmarker dar, die eine grobe Einordnung der untersuchten DNA-Moleküle erlauben. Rot ... Bereich erhöhter Diversität (Bacteria). Blau ... Bereich geringerer Diversität (Archaea).
 Fig. 5: DGGE of selected moonmilk samples. Depending on their species dependent composition DNA molecules migrate differently, and are therefore distinguishable. The strongly varying band patterns of the individual samples are obvious. The brighter columns in the center and at the margins are orientation markers which allow a rough classification of the respective DNA molecule. Red ... area of high diversity (bacteria), blue ... area of low diversity (archaea).

die Anzahl vorhandener Archaea bestimmt. Überraschenderweise, aber aufgrund der weitaus höheren Sensitivität dieser Methode gegenüber einer herkömmlichen PCR vertrauenswürdig, konnten in allen untersuchten Proben Archaea detektiert werden, im Bereich von tausend bis zu einer Million Individuen pro mL Bergmilch.

Eine nachfolgende DGGE-Analyse führte zu den in Abb. 5 dargestellten Ergebnissen. Die komplexen Bandenmuster der Bacteria (20 – 35 Banden, rot umrahmt) deuten auf eine erstaunlich diverse Organismenzusammensetzung in den untersuchten Bergmilchproben hin. Die Archaea-Community ist hingegen mit ca. 5 – 14 unterscheidbaren Banden (blau umrahmt) deutlich artenärmer bzw. sind einige wenige Archaea-Species in allen untersuchten Bergmilchproben sehr dominant. Eine hohe mikrobielle Diversität deckt sich mit ähnlichen Studien (Barton & Jurado, 2007; Mulec, 2008; Northup et al., 2000). Unter Ressourcenmangel bilden sich häufig erstaunlich komplexe mikrobielle Lebensgemeinschaften mit sehr vielen verschiedenen

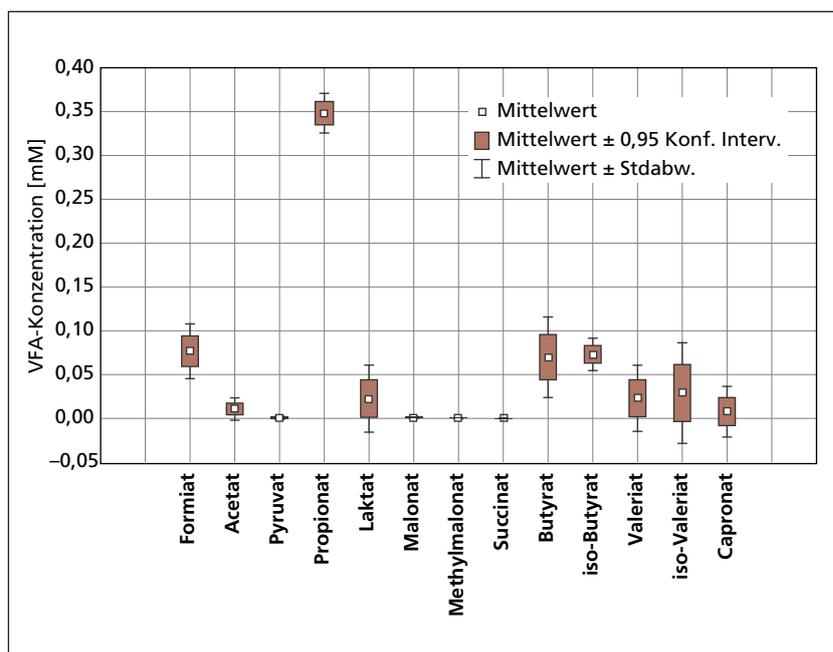


Abb. 6: Konzentrationen von organischen Säuren in den 14 untersuchten Bergmilch-Proben der ersten Probenahme. X-Achse: VFAs (flüchtige Fettsäuren), kurzkettige organische Säuren, Y-Achse: VFA-Konzentration. Die Säuren sind entsprechend ihrer C-Anzahl ansteigend von links nach rechts angeordnet. Fig. 6: Concentrations of organic acids detected in 14 investigated moonmilk samples from the first sampling campaign. X-axis: VFAs – volatile fatty acids, Y-axis: VFA concentration. The acids are arranged according to their carbon numbers, increasing from left to right.

Arten aus (Barton & Jurado, 2007). Eine Erklärung hierfür ist, dass sich in derartigen nährstoffarmen Habitaten häufig synergistische, d.h. zu beiderseitigem Nutzen bestehende Interaktionen zwischen Mikroorganismen finden, wohingegen in eutrophen (nährstoffreichen) mikrobiellen Systemen häufig eine von Konkurrenz geprägte Nahrungspyramide anzutreffen ist (Barton & Jurado, 2007). Bei suboptimalen Bedingungen kooperieren also viele hoch-spezialisierte Organismen zu gegenseitigem Nutzen, während im Überfluss wenige konkurrenzstarke Vertreter dominieren.

Bei DGGE-basierten Studien muss allerdings beachtet werden, dass in prokaryotischen Zellen mehrere unterschiedliche Gen-Varianten (Operons) vorliegen können. Dieses Phänomen der Operon-Heterogenität, führt dazu, dass ein Organismus bei Untersuchung mit der PCR/DGGE-Methodik zu mehr als einer Bande und damit zu einer Überschätzung der Artendiversität führen kann (Muyzer & Smalla, 1998). Umgekehrt besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass auf selber Höhe zu liegen kommende Banden unterschiedlicher Herkunft sind (Muyzer et al., 1993) oder eine Bande die Erbinformation mehrerer Quellen vereint (Sekiguchi et al., 2001). Eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse bedarf deshalb teils umfangreicher und genauer Nachfolgeuntersuchungen.

Eine Stärke der DGGE Methode ist jedoch wiederum, dass isolierte (und identifizierte) Reinkulturen unbekannter Kulturen, über gleiche DNA-Bandenmuster bzw. -Laufhöhen, zugeordnet werden können. Daraus

ergibt sich die Möglichkeit, die zwei komplementären Untersuchungsansätze, Kultivierung und DNA-Analysen, miteinander in Beziehung zu bringen. Dies erspart weitgehend die aufwändigen und kostenintensiveren Wege der Vereinzelung von DNA-Spezies mittels Klonierung oder DGGE-basierter DNA-Banden-Vereinzelung. Für vollständigere Analysen mikrobieller Habitate sind diese Methoden aber dennoch unumgänglich.

Abschließend wurde von einer Reihe von Reinkulturen die DNA extrahiert, gereinigt und sequenziert um die konkrete Spezies bestimmen zu können. Bis dato konnten aus den untersuchten Proben der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle Vertreter der Actinobacteria (*Arthrobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*), Alphaproteobacteria (*Brevundimonas sp.**, *Sphingomonas sp.**), Bacteroidetes (*Flavobacterium sp.*), Firmicutes (*Exiguobacterium sp.*, *Paenibacillus sp.**, *Paenisporosarcina sp.**, *Sporosarcina sp.**) und Gammaproteobacteria (*Pseudomonas sp.*) nachgewiesen werden (Abteilungen und Gattungen, deren Vertreter in vergleichbaren Studien über Höhlenbewohnende Mikroorganismen unseres Wissens nach noch nie detektiert wurden, sind mit einem Stern markiert). Bei allen identifizierten Organismen handelt es sich um Vertreter der Domäne Bacteria. Aus der untersuchten Bergmilch konnten Archaea, trotz molekularbiologischem Nachweis, bislang noch nicht kultiviert werden. Die Kultivierbarkeit von Archaea ist aber generell schwierig, sei es aus Mangel an Kenntnissen über deren Ansprüche oder aufgrund der im

Labor nur schwer einzuhaltenen sehr spezifischen Kultivierungsansprüche. Während Pilze mit molekularbiologischen Methoden in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden konnten, war die Lebendanzucht einiger weniger Vertreter erfolgreich, was einmal mehr auf die deutlich niedrigeren Detektionslimits kulturtechnischer Verfahren hinweist (Wagner et al., 2009). Es konnten Vertreter der zwei großen Pilzgruppen der Ascomycota (*Illotsporium sp.*) sowie den Basidiomycota (*Rhodotorula sp.*) zugeordnet werden.

Organische Verbindungen – Lebensgrundlage oder Produkt?

Eine der grundlegenden Fragestellungen in Zusammenhang mit Bergmilch, ist die Frage nach dem Energie- und Nährstoffeintrag. Um sich dieser Frage anzunähern, wurden die Proben der ersten Entnahme (Oktober 2010) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf das Vorkommen einfacher organischer Säuren hin untersucht. Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Hochdruck-Trenn- und Analyseverfahren für verschiedenste organische Moleküle, welches sich unter anderem Größen-, Ladungs- oder Wasserlöslichkeitsunterschiede der zu untersuchenden Substanzen zu Nutze macht (Berg et al., 2007). Der Nachweis derartiger kohlenstoff- und energiereicher Verbindungen kann zudem als ein Indiz für das Vorkommen von Lebewesen gewertet werden. Wie in Abb. 6 ersichtlich ist, konnten insgesamt 13 verschiedene kurzkettige organische Säuren nachgewiesen werden. Auffallend dabei war, dass in allen Proben Formiat, Propionat und iso-Butyrat detektiert werden konnte, wobei die Konzentration von Propionat deutlich höher als die der anderen Säuren war. Dies ist insofern erstaunlich, als Propionat als typisches Intermediat des anaeroben Stoffwechsels (z.B. von *Propionobacter sp.*) in aeroben Habitaten normalerweise nicht in relevanten Konzentrationen zu finden ist. Der Frage nach der Herkunft so großer Propionatmengen wird in weiterführenden Untersuchungen jedenfalls genauer nachgegangen werden müssen. Während Acetat, Lactat, Butyrat, Valeriat und iso-Valeriat noch in nennenswerten Konzentrationen vorlagen, waren andere biologisch relevante Säuren, wie etwa Pyruvat, nur in Spuren nachweisbar. Bemerkenswert war, dass Capronat in deutlichen Mengen und ausschließlich in einer Probe detektierbar war.

Auch wenn die Konzentrationen der einzelnen organischen Verbindungen teils weit unter 0,5 mM liegen, sind dies trotzdem beachtliche Werte, die insbesonde-

re in einem als oligotroph eingestuften Habitat Leben ermöglichen könnten. Andererseits sind diese Verbindungen auch ein Indiz für mikrobiologische Stoffwechselaktivität, sodass sich die Frage stellt, ob diese organischen Verbindungen Grundlage oder das Produkt mikrobieller Aktivität sind.

Auch wenn viel für einen mikrobiellen Ursprung der organischen Säuren spricht, kann auch eine externe Quelle dieser Verbindungen nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Innerhalb der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle tritt Bergmilch vor allem an Stellen auf, an denen durch Risse und Störungen im Muttergestein Sickerwasser, welches wahrscheinlich mit organischen Auswaschungsprodukten der darüber liegenden Bodenschichten beladen ist, hervortritt, wie es auch in vergleichbaren Untersuchungen festgestellt wurde (Cañaveras et al., 2006; Curry et al., 2009). Auch wenn der eisfreie Bereich der Höhle nur über den vereisten Schaubereich der Höhle zugänglich und dieser Zugang versperrt ist, wurde das Vorkommen von Fledermäusen im eisfreien Bereich beobachtet (die im eisführenden Stockwerk fehlen). Dies lässt den Schluss zu, dass ein weiterer, bis dato noch unbekannter, Zugang zu diesem Areal besteht. Tiere sowie Luftzirkulationen und damit verbunden das Einbringen von Mikroorganismen können somit einen gewissen Eintrag an Organismen und organischem Material in diesen Bereich erklären (Barton & Northup, 2009; Mulec, 2008).

Die vorliegende Studie ist als eine erste Annäherung an das Thema der Bergmilch in der Hundalm-Höhle zu sehen. Weiterführende Analysen, wie zum Beispiel die Untersuchung der fels- und wasserassoziierten Mikroflora in der Höhle oder eine umfassendere Analyse organischer Bestandteile sind noch ausständig aber bereits in Planung. Auf Basis der bislang vorliegenden Daten kann aber bereits jetzt zusammenfassend festgehalten werden, dass in den Bergmilchproben aus der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle durch die Kombination von kulturtechnischen und molekularbiologischen Methoden eine erstaunlich komplexe, oligotrophe, psychrophile mikrobielle Gemeinschaft bestehend aus Archaea, Bacteria und Pilzen nachgewiesen werden konnte. Diese Mikroorganismen sind zum Teil in bemerkenswert hohen Zahlen vorhanden, wie sie üblicherweise in weniger extremen Habitaten wie zum Beispiel Böden und Oberflächengewässern vorzufinden sind. Diese Ergebnisse lassen weitere Untersuchungen sinnvoll erscheinen, speziell um Fragestellungen nach der Beteiligung von Mikroorganismen an der Bergmilchentstehung und Fragen nach dem Energie- und Nährstoffinput in das System auf den Grund gehen zu können.

AUSBLICK

Das Phänomen der Biomineralisation und die Beteiligung diverser Mikroorganismen daran sind bekannt. Wie jedoch das Ökosystem Bergmilch letztendlich funktioniert, bleibt bis dato lückenhaft verstanden (Cuezva et al., 2009). Höhlen bieten aufgrund der zu meist stabilen Umweltbedingungen (sehr geringe Temperaturschwankungen und sehr hohe Luftfeuchtigkeit) ein ideales Habitat um die abiotischen und biotischen Prozesse, die zur Biomineralisation und Gesteinsumwandlungen führen, studieren und besser verstehen zu können (Cañaveras et al., 2006). Ebenso können Anpassungsstrategien an niedrige Nährstoffkonzentrationen (Oligotrophie) anhand dieses Ökosystems erforscht werden (Barton & Northup, 2007). Wesentliche Fragestellungen im Zusammenhang mit belebten höhleninternen Systemen wie der Bergmilch betreffen vor allem die Art der Energiekonservierung und den Eintrag an Nährstoffen und auch an Mikroorganismen selbst in das Höhlensystem (Curry et al., 2007). Auch wenn man als primäre Stufe der Nahrungskette autotrophe Pionierorganismen annimmt (Cañaveras et al., 2006; Mulec, 2008; Rooney et al., 2010), sind laut Literatur (Cuezva et al., 2009; Curry et al., 2009; Portillo & Gonzalez, 2011) und der vorliegenden Untersuchung in der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle überwiegend heterotrophe Organismen in den Bergmilch-Ablagerungen vorhanden bzw. damit

assoziiert. Ob deren Dasein allein über das Vorhandensein von Primärproduzenten erklärt werden kann oder ob externe Quellen für den Input an organischen Verbindungen in dieses System sorgen, ist fraglich. Auch ein anthropogener oder zoogener Eintrag an Organismen und organischem Material ist nicht ganz außer Acht zu lassen, sollte jedoch, was die Verunreinigung durch den Menschen betrifft, maximal das Auftreten von oberflächennahen Kontaminationen erklären, da die Bergmilch-Ablagerungen an der beprobten Stelle sicher wesentlich weiter zurückdatieren als die erste Begehung durch Höhlenforscher im Jahr 1984. Weitere interessante Fragestellungen sind, ob und wenn ja wie, sich die Zusammensetzung von mikrobiellen Gesellschaften und mikrobielle Abundanzen in Abhängigkeit von makroskopischer Struktur, Färbung (in Verbindung mit der chemischen bzw. mineralogischen Zusammensetzung), Lage und Tiefe unterscheiden (Northup et al., 2000). Sind anaerobe Mikroorganismen und/oder neue Arten mit potentiell biotechnologischem oder medizinischem Nutzen anzutreffen? Welche Rolle spielen die Organismen im Ausfällungsprozess, der zur Bergmilch-Entstehung führt, und sind sie dafür unerlässlich?

Es öffnet sich also eine ganze Reihe von spannenden Fragestellungen, deren Bearbeitung hoffentlich mehr Licht in das Dunkel um die Bergmilch bringen wird.

LITERATUR

- Barton, H. A. (2006): Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. – *Journal of Cave and Karst Studies*, 68: 43–54.
- Barton, H. A. & Jurado, V. (2007): What's up down there? Microbial diversity in caves. – *Microbe*, 2: 132–138.
- Barton, H. A. & Northup, D. A. (2007): Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. – *Journal of Cave and Karst Studies*, 69: 163–178.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2007): *Stryer Biochemie*. – München (Elsevier GmbH).
- Campbell, N. A. & Reece, J. B. (2009): *Biologie*. – München (Pearson Education Deutschland GmbH).
- Cañaveras, J. C., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Lario J., Laiz, L., Gonzalez, J. M. & Saiz-Jimenez, C. (2006): On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. – *Naturwissenschaften*, 93: 27–32.
- Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. & Cañaveras, J. C. (2009): Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira Cave, Spain. – *International Journal of Speleology*, 38: 83–92.
- Curry, M. D., Boston, P. J., Spilde, M. N., Baichtal, J. F. & Campell, A. R. (2009): Cottonballs, a unique subaqueous moonmilk, and abundant subaerial moonmilk in Cataract Cave, Tongass National Forest, Alaska. – *International Journal of Speleology*, 38: 111–128.
- Frisia, S., Borsato, A. (2010): Karst. – In: Alonzo-Zarza, A.M. & Tanner, L.H. (Hrsg.): *Carbonates in continental settings: facies, environments, and processes. – Developments in Sedimentology*, 61, 269–318, Amsterdam (Elsevier).
- Gonzalez, J. M., Portillo, M. C. & Saiz-Jimenez, C. (2006): Metabolically active Crenarchaeota in Altamira Cave. – *Naturwissenschaften*, 93: 42–45.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. – *Nature Reviews Microbiology*, 2: 95–108.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2003): *Brock Mikrobiologie*. – Berlin (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg).
- Meyer, S. & Plan, L. (2010): Pool-Fingers – eine kaum bekannte Sinterform biogenen Ursprungs. – *Mitt. Verb. dt. Höhlen- u. Karstforscher*, 56: 104–108.
- Mulec, J. (2008): Microorganisms in hypogean: Examples from Slovenian Karst caves. – *Acta Carsologica*, 37: 153–160.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for

- 16S rRNA. – *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695–700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. – *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127–141.
- Northup, D. E. & Boston, P. J. (2005): Microbial speleology: Opportunities and challenges. – 17th National Cave and Karst Management Symposium Proceedings, 27–34. NCKMS, Albany, NY.
- Northup, D. E., Dahm, C. N., Melim, L. A., Spilde, M. N., Crossey, L. J., Lavoie, K. H., Mallory, L. M., Boston, P. J., Cunningham, K. I. & Barns, S. M. (2000): Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe Caves. – *Journal of Cave and Karst Studies*, 62: 80–90.
- Paoletti, M. G., Beggio, M., Dreon, A. L., Pamio, A., Gomiero, T., Brilli, M., Dorigo, L., Concheri, G., Squartini, A. & Summers Engel, A. (2011): A new foodweb based on microbes in calcitic caves: The *Cansiliella* (beetles) case in Northern Italy. – *International Journal of Speleology*, 40: 45–52.
- Portillo, M. C. & Gonzalez, J. M. (2010): Differential effects of distinct bacterial biofilms in a cave environment. – *Current Microbiology*, 60: 435–438.
- Portillo, M. C. & Gonzalez, J. M. (2011): Moonmilk deposits originate from specific bacterial communities in Altamira Cave (Spain). – *Environmental Microbiology*, 61: 182–189.
- Richter, D.K., Immenhauser, A. & Neuser, R.D. (2008): Electron backscatter diffraction documents randomly oriented c-axes in moonmilk calcite fibres: evidence for biologically induced precipitation. – *Sedimentology*, 55: 487–497.
- Rooney, D. C., Hutchens, E., Clipson, N., Baldini, J. & McDermott, F. (2010): Microbial community diversity of moonmilk deposits at Ballynamintra Cave, Co. Waterford, Ireland. – *Environmental Microbiology*, 60: 753–761.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T. & Uchiyama, H. (2001): A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. – *Biotechnology Letters*, 23: 1205–1208.
- Spötl, C. (2011): Das Höhlenklima-Messprogramm in der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle – Zwischenbericht 2010. – *Höhlenkundliche Mitteilungen des Landesvereins für Höhlenkunde in Tirol*, 49: 18–23.
- Spötl, C. & Obleitner, F. (2008): Ausbau des Klima- und Eis-Messprogramms in der Hundalm Eis- und Tropfsteinhöhle. – *Höhlenkundliche Mitteilungen des Landesvereins für Höhlenkunde in Tirol*, 46: 2–9.
- Wagner, A.O., Malin, C., Gstraunthaler, G. & Illmer, P. (2009). Survival of selected pathogens in diluted sludge of a thermophilic waste treatment plant and in NaCl-solution under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management* 29, 425–429.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Die Höhle](#)

Jahr/Year: 2012

Band/Volume: [063](#)

Autor(en)/Author(s): Reitschuler Christoph, Spötl Christoph, Illmer Paul

Artikel/Article: [Zur Mikrobiologie von Bergmilch 3-17](#)