

Untersuchung von gesteinsbesiedelnden Cyanobacteria und melanisierten Pilzen hinsichtlich der Biodeterioration und der beeinflussenden Komponenten

Romy Breitenbach, Franz Seiffert; Jörg Toepel

Einleitung:

Biofilme auf Gesteinsoberflächen sind oft durch das Vorkommen von melanisierten Pilzen und Cyanobakterien gekennzeichnet. Zwei Organismengruppen, die sich durch eine extrem hohe Stresstoleranz auszeichnen. Neben der Besiedelung von natürlichen Felsformationen durch diese Organismen kann es auch auf künstlichen Gesteinsformationen zu einer Biofilmentwicklung kommen. Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen der Biofilmentwicklung auf die Gesteinsoberfläche und besonders hinsichtlich der biogen induzierten Deterioration sind notwendig, um die ablaufenden Prozesse zu verstehen. Im Hinblick auf Gebäude und Denkmäler aus Stein sind chemische und physikalische Prozesse gut erforscht, der biologische Anteil an der Verwitterung wurde bislang nicht genau untersucht. Wobei dabei zu beachten ist, dass diese Prozesse nicht immer eindeutig zu trennen sind. Hinsichtlich der biogen induzierten Gesteinsverwitterung sind generell die genauen Mechanismen nicht endgültig erklärt, und spezielle Deteriorationsraten wurden bislang nicht ermittelt.

Eine besondere Bedeutung, sowohl bei der Besiedelung von Gesteinen, als auch bei der Verwitterung, besitzen die extrazellulären Substanzen. Dabei ermöglichen die extrazellulären Polymere (EPS), die organischen Säuren, Quorum Sensing Moleküle und spezielle Schutzsubstanzen (z.B. UV-Schutzpigmente) sowohl die Anhaftung als auch eine für die Verwitterung günstige Änderung des Mikroklimas. Die EPS reduzieren die Austrocknungsgefahr, erhöhen die Widerstandsfähigkeit der darin lebenden Organismen gegenüber anderen Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung und Bioziden und verbessern die Interaktion mit der Gesteinsoberfläche.

Ziel dieser Studie war es, die Biofilmentwicklung auf Gesteinsoberflächen und die Anpassungsmechanismen an wechselnde Umweltbedingungen zu dokumentieren. Zudem sollte die biogen induzierte Verwitterung von Gestein und die Auswirkungen auf die Gesteinsoberfläche als Folge der biologischen Aktivität ermittelt werden.

Biofilmstruktur in Abhängigkeit von der Gesteinsoberfläche und der Wasserverfügbarkeit

Die Biofilmstruktur wurde mit Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Dafür wurden *Nostoc punctiforme* und *Knufia petricola*, Organismen die typischerweise auf Gesteinen Biofilme bilden, auf verschiedenen Gesteinen mit unterschiedlicher Wasserverfügbarkeit (Durchflusssystem und Feuchte Kammer) angezogen und die Zellen und die EPS visualisiert. Dafür mussten in einem ersten Schritt geeignete Fluorophor markierte Lektine für die einzelnen Komponenten gefunden werden. Für Zellen von *K. petricola* wurde das Lektin UDA (isoliert aus *Urtica dioica*), für Zellen von *N. punctiforme* das Lektin LEA (isoliert aus *Lycopersicon esculentum*) und für die *Nostoc* EPS das Lektin AAL (isoliert aus

Aleuria aurantia) als das am besten funktionierende identifiziert. Die Verwendung dieser Lektine mit daran gekoppelten Farbstoffen ist für Einzel- und Mischkulturen in Abb.1 gezeigt.

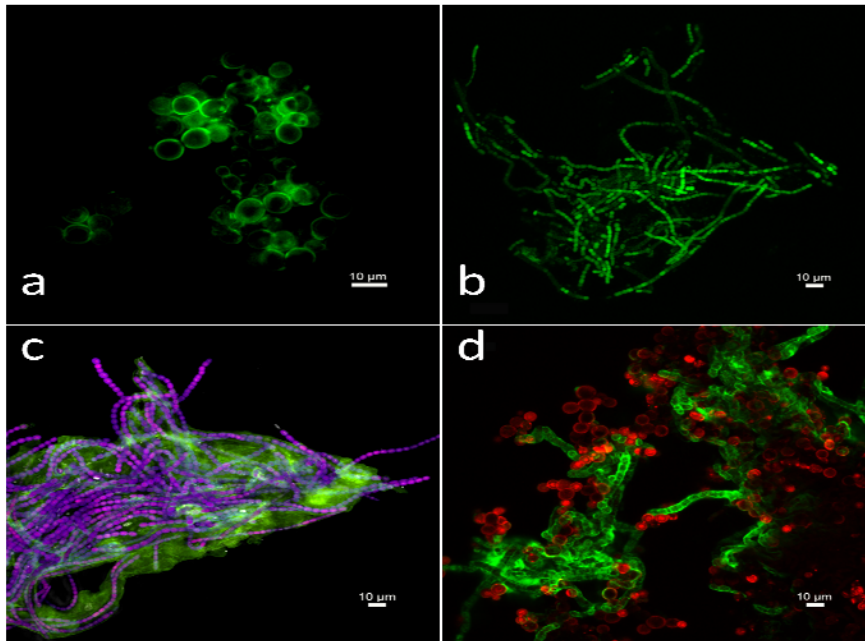


Abb.1: Einsatz identifizierter spezifischer Lektine, die für Lektin-Bindungs-Analysen der Struktur von Biofilmen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* auf verschiedenen Gesteinen und unter unterschiedlichen Bedingungen verwendet werden können. (a) UDA bindet spezifisch an Zellen von *K. petricola*. Durch zusätzliche FITC-Bindung erscheinen die Zellen hier grün. (b) LEA bindet spezifisch an Zellen von *N. punctiforme*. Durch zusätzliche FITC-Bindung erscheinen die Zellen hier grün. (c) AAL bindet spezifisch an die EPS von *N. punctiforme*. Durch zusätzliche A488-Bindung erscheint die EPS grün, die hier autofluoreszierenden Zellen erscheinen violett. (d) UDA bindet an *K. petricola*-Zellen und erscheint hier durch TRITC-Bindung rot, LEA bindet an *N. punctiforme* Zellen und erscheint durch A488-Bindung grün.

Durch die ausgewählten Lektine lassen sich demnach Zellen beider Biofilmpartner sowie die EPS von *N. punctiforme* in komplexen Biofilmstrukturen differenzierend visualisieren. Der Vergleich des Wachstums auf unterschiedlichen Gesteinen unter relativem Wassermangel ist in Abb.2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die *K. petricola*-Zellen generell in den unteren Schichten des Biofilms in unmittelbarer Nähe zum Gestein wachsen und bzgl. ihrer Morphologie keine signifikanten Unterschiede auf den verschiedenen Gesteinen zeigen.

N. punctiforme hingegen erscheint besonders hinsichtlich der ausgebildeten EPS abhängig vom als Substrat verwendeten Gestein. Auf Marmor zeigt *N. punctiforme* filamentöses Wachstum, allerdings ist hier keine EPS-Schicht zu erkennen (Abb.2a). Da der Marmor keine eigene Wasserspeicherkapazität besitzt und die EPS normalerweise als Wasserspeicher dienen, ist dies unerwartet. Die EPS Produktion scheint meist an eine bestimmte Wasserverfügbarkeit gebunden zu sein, wie die EPS Schicht auf den anderen Gesteinsarten demonstriert. Auf den anderen Gesteinen, die aufgrund ihrer Porosität eine größere Wasserspeicherkapazität besitzen, wächst *N. punctiforme* in Zellpaketen mit einer z.T. hohen EPS Produktion (Abb.2 b-d). Der Bewuchs von Materialien wird wahrscheinlich zusätzlich durch die Rauheit der Oberfläche beeinflusst, eine glattere Oberfläche kann dementsprechend die Kolonisierung erschweren. Speziell für Marmor kann im Vergleich zu raueren Kalksteinen eine deutlich geringere Kolonisierung mit anderer, flacherer Biofilmstruktur gezeigt werden.

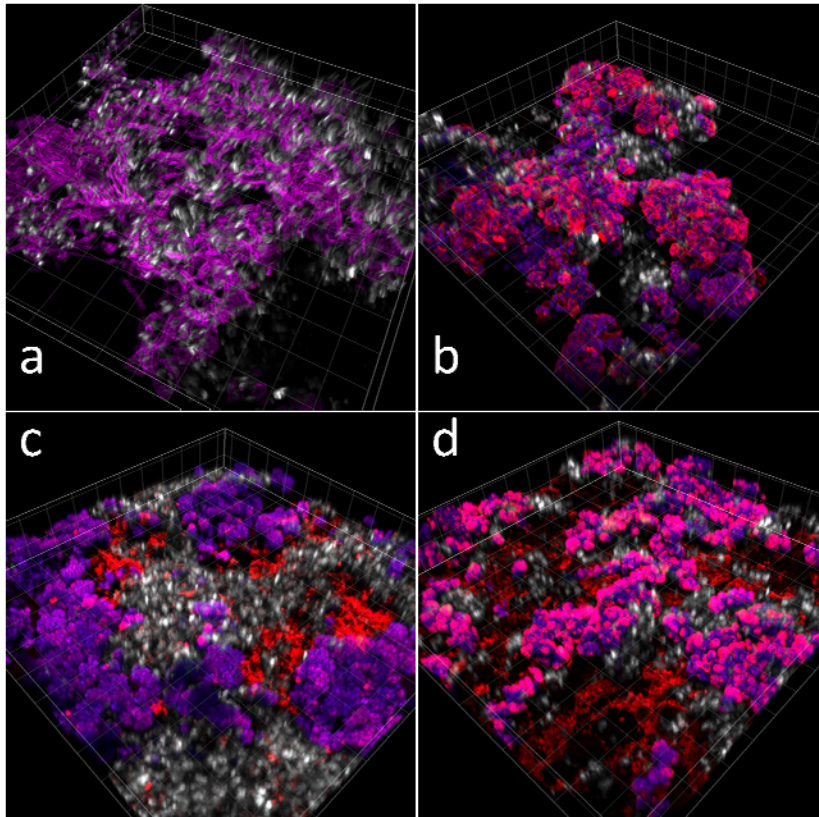


Abb.2: Vergleich der Struktur eines Biofilms aus *K. petricola* und *N. punctiforme* nach 4 Wochen Wachstum unter diskontinuierlichen Bedingungen in einer feuchten Kammer auf (a) Marmor, (b) Postaer Sandstein, (c) Ettringer Tuff und (d) Baumberger Sandstein. (a) *K. petricola*-Zellen erscheinen weiß (Calcofluor-White-Färbung) und sind im unteren Teil des Biofilms als einzelne Zellen oder Mikrokolonien zu finden (ebenso bei b-d). *N. punctiforme* Zellen erscheinen violett (Autofluoreszenz) und wachsen filamentös; eine EPS-Produktion ist nicht zu erkennen. (b-d) *N. punctiforme* Zellen erscheinen violett (Autofluoreszenz) und wachsen als Zellpakete. Die EPS (A568-Bindung) erscheint rot zwischen und rosafarben auf Zellpaketen. Sie wird materialabhängig gar nicht (a), auf den Zellpaketen (b), zwischen den Zellpaketen (c) oder auf und zwischen den Zellpaketen (d) ausgebildet.

Generell ist festzustellen, dass sich *K. petricola* in den unteren Schichten des Biofilms befindet, unabhängig von der verwendeten Kultivierungsbedingung. Diese Art der räumlichen Aufteilung mit *N. punctiforme* in den oberen und *K. petricola* in den unteren Schichten ist aus vorhergehenden Studien mit dem hier verwendeten Biofilm bekannt. Es ist dabei bemerkenswert dass nur *N. punctiforme* eine nachweisbare EPS-Schicht ausbildet. Die starke EPS-Produktion in natürlichen Biofilmen durch Cyanobakterien ist weitreichend beschrieben und für *Nostoc*-Arten ist bekannt, dass die EPS bis zu 60% des Trockengewichts eines Biofilms ausmachen kann. *N. punctiforme* kann durch die EPS-Ausscheidung und durch weniger kompaktes Wachstum gegenüber *K. petricola* einfacher größere Areale auf einer Gesteinsoberfläche besiedeln und somit auch höhere Schichten im Biofilm einnehmen. *K. petricola* wächst hingegen direkt an der Grenzfläche zum Gestein und bildet dort kompakte Kolonien aus. Eine solche kompakte Mikrokolonieform direkt an der Gesteinsoberfläche bietet weniger Angriffsmöglichkeiten für Stressfaktoren und stellt zudem ein thermodynamisch günstiges Oberflächen-Volumen-Verhältnis dar, was sich besonders unter trockenen Bedingungen vorteilhaft auswirken kann. Die unterschiedliche Morphologie von *N. punctiforme* Filamenten auf den unterschiedlichen Gesteinen geht sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlich gute Wasserverfügbarkeit zurück. Unter Stressbedingungen können Cyanobakterien solche Zellpakete ausbilden, wie sie in den Experimenten hier beobachtet wurden. Da in den feuchten Kammern deutlich weniger Wasser für die Mikroorganismen verfügbar war als in den Durchfluss-Systemen,

konnte in ersteren auch weniger EPS-Material produziert werden. Durch die geringere Wasserverfügbarkeit und die daraus resultierende nachweislich geringere EPS-Produktion (Abb.2a) sind die Zellen im Biofilm stärker den umweltbedingten Stressbedingungen wie z.B. der Lichteinstrahlung ausgesetzt, sodass die kompakten Zellpakete als angepasste Form des Wachstums ausgebildet werden. Ist hingegen genügend Wasser vorhanden, wie im Fall des Durchfluss-Systems, so ist dieses nicht nur den Zellen direkt verfügbar, sondern kann auch in die Produktion einer massiven EPS-Schicht verarbeitet werden. Die Zellen selbst wachsen wie in Flüssigkulturen in Filamenten und können so größere Areale auf dem Gestein besiedeln. Die Entstehung und Funktion der beschriebenen Zellpakete ist viel diskutiert, sie werden als ein Stadium von losgelösten Hormogonien gesehen, die sich manchmal bilden, oder einfach als freigesetzte Zellcluster, die entstehen, wenn ein Filament aufbricht. Das Zusammendrücken von Zellpaketen wird auch auf den äußeren Druck der die Zellen umgebenden Hülle zurückgeführt. Wenn in den jeweiligen Einsenkungen rauer Oberflächen der Druck auf sich dort anlagernde Zellhaufen erhöht wird, könnte erklärt werden, wieso auf der Mamoroberfläche kein Zellpaket-Wachstum stattfindet, auf den porösen Gesteinen aber schon. Weitere Unterschiede in der Biofilmstruktur konnten hinsichtlich der EPS Produktion dokumentiert werden. Bei Wachstum auf Postaer Sandstein werden *N. punctiforme* EPS auf der Oberfläche der Zellpakete ausgebildet, aber nicht zwischen Zellpaketen. Bei Wachstum auf Ettringer Tuff hingegen liegen die EPS ausschließlich zwischen den Zellpaketen, während sie auf Baumberger Sandstein sowohl zwischen als auch auf der Oberfläche von Zellpaketen zu finden sind. Die Gesteine unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung, sondern auch bzgl. der Parameter Porosität, Wasseraufnahme und spezifischer Oberfläche, was die Effekte hinsichtlich der Biofilmstruktur erklären könnte. Da Postaer Sandstein größere mittlere Porengrößen aufweist als die anderen Gesteine und zudem aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung weniger Nährstoffe und Angriffspunkte für Auflösprozesse liefert, ließe sich die geringere EPS-Produktion über eine kleinere Wasseraktivität und weniger verwendbare Nährstoffe aus dem Gestein erklären.

EPS Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Gesteinsoberfläche

Um die freien und die gebundenen EPS, isoliert von den Gesteinsbiofilmen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu analysieren wurde eine HPLC basierte Methode Etabliert. Die EPS wurden dafür hydrolysiert und die Monosaccharidzusammensetzung anschließend mittels HPLC bestimmt. Das verwendete HPLC-System umfasste das 1100 LC-System mit 6130 Single Quadrupol-LC/MS der Firma Agilent Technologies, sowie eine SeQuant® 3,5 µm ZIC®-HILIC Säule mit einer 5 µm ZIC HILIC Vorsäule der Firma Merck. Als mobile Phase wurde 90% Acetonitril/0,1% Ameisensäure mit einer Flussrate von 0,4 ml/min eingesetzt. Fructose, Sorbose, Glucose, Mannose, Galactose und myo-Inositol wurden als Referenzzucker mitgeführt. Wie Abbildung 3 zeigt, ermöglicht die dargestellte Methode die Auftrennung und Identifizierung der Monosaccharide Fructose, Glucose, Galactose und myo-Inositol. Die exakte Auftrennung und Bestimmung von Sorbose und Mannose ist mit der gewählten Methode jedoch nicht möglich, da die entsprechenden *peaks* eine Überlagerung im Chromatogramm aufweisen. Des Weiteren bildet Glucose während der Auftrennung zwei *peaks* und zeigt somit eine Überlagerung mit Mannose. Der zweite *peak* erlaubt dennoch eine genaue Glucosebestimmung. Insgesamt ermöglicht die oben aufgeführte Methode eine eindeutige Identifizierung der, in der aus Biofilmen isolierten EPS, vorhandenen Monosaccharide und kann daher zukünftig für die Analyse von Kohlenhydraten in Biofilmen, die unter verschiedenen Bedingungen angezogen wurden, genutzt werden.

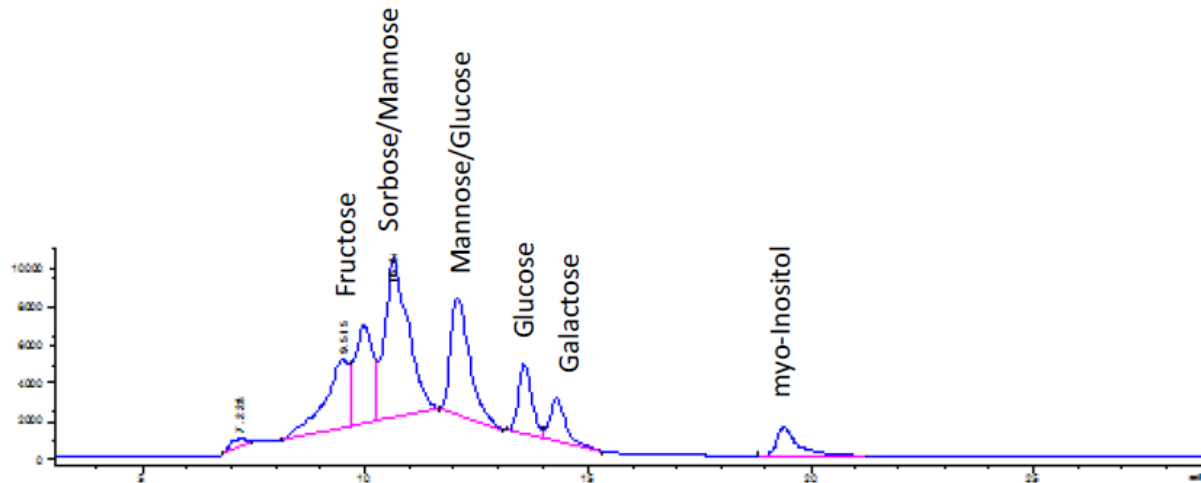


Abbildung 3: HPLC-Chromatogramm von verschiedenen Monosacchariden, zur Bestimmung der EPS bildenden Komponenten (Details siehe Text).

Biogen induzierte Verwitterung von Gestein

Um biogen induzierte Verwitterung zu dokumentieren und vor allem um Deteriorationsraten zu bestimmen, wurden die beiden biofilmbildenden Organismen auf Granit in einem geschlossenen System kultiviert. Die Verwitterung von Granit spielt eine große Rolle in der Erdbildung und der biogene Anteil an diesem Prozess ist unbekannt. In dieser Studie zur biotisch induzierten Gesteinsverwitterung wurden unter Verwendung der beiden Modellorganismen hauptsächlich Kalzium, Eisen, Kalium, Magnesium und Mangan als aus Granit in relevanter Weise herausgelöste Elemente nachgewiesen. Die Elemente Kalzium, Natrium, Magnesium und Mangan wurden in den biotischen Proben in signifikant höheren Konzentrationen in dem Medium (Eluat aus den Gesteinen) gemessen. Sowohl in den biotischen als auch in den abiotischen Proben wies dabei Kalzium die höchsten Konzentrationen auf, gefolgt von Natrium; beide Elemente stammen wahrscheinlich zu einem großen Teil aus einem Albit-ähnlichen Plagioklas im Granit. Die Konzentrationen von Magnesium und Mangan lagen eine Größenordnung niedriger; diese Elemente wurden wahrscheinlich aus einem Biotit herausgelöst. Die Reihenfolge und das Ausmaß der Elementauflösung aus dem Granit hängt von der Mengenverteilung der einzelnen Minerale im Gestein und ihrem Vorhandensein an Grenzflächen, von den chemischen Auflöseraten dieser Minerale und von ihrer Verfügbarkeit für Mikroorganismen ab. Im vorliegenden Granit ist daher in Anbetracht seiner mineralogischen Zusammensetzung zu erwarten, dass zuerst Natrium und Kalzium herausgelöst werden, Kalium aus Mikroklin und Biotit sowie Mangan und Magnesium aus Biotit hingegen erst in späteren Stadien.

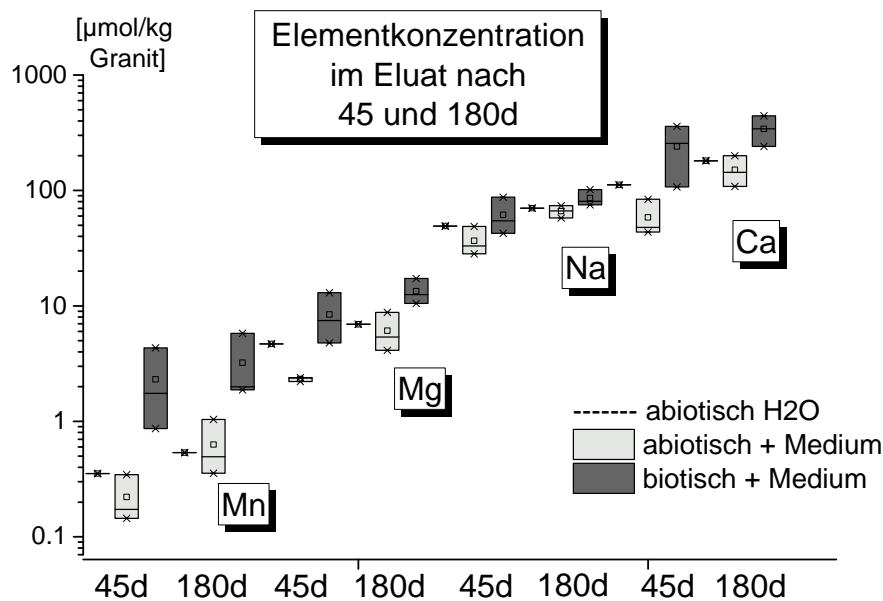


Abb.4: Per ICP-MS/OES gemessene Elementkonzentrationen in den Eluaten von Durchfluss-Experimenten zur biologischen Granitverwitterung nach 45 und 180 d Inkubation für die Elemente Mn, Mg, Na und Ca in einer Boxplot-Darstellung (n=3 für biotische und abiotische Proben mit Medium, n=1 für abiotische Proben mit Wasser).

Die Verfügbarkeit einzelner Elemente für Mikroorganismen hängt natürlich auch in erster Linie von der relativen Menge entsprechender Minerale und deren Auflöseraten ab. Die biotisch induzierte Auflösung ist oft indirekter Natur und agiert über die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, die hydrolytische Prozesse in Gang setzen können. Es können von einigen Organismen zwar auch gezielt Elemente katalytisch mobilisiert werden, diese Mechanismen sind allerdings sehr spezifischer Natur und bisher nur für einige spezialisierte Bakterien- und Archaeengruppen beschrieben worden. Die Selektion essenzieller Elemente zur Akkumulation seitens der Mikroorganismen erfolgt aber meist sekundär, die vorherige Elementauflösung gehorcht, auch wenn sie biotisch induziert ist, der Kinetik der Auflöseraten und der Abundanz einzelner Minerale, unabhängig von deren biologischer Relevanz. Die hohen Kalzium- und Natriumwerte in den Eluaten liegen somit wahrscheinlich daran, dass der Albit-ähnliche Plagioklas aufgrund seiner vergleichsweise hohen chemischen Auflöseraten nach 180 d wesentlich stärker verwitterte als die anderen Minerale im Granit. Die gemessenen Kalium-, Magnesium- und Manganwerte zeigen, dass auch der Mikroklin-ähnliche Feldspat und Biotit teilweise aufgelöst wurden. Die höheren Werte für Kalzium, Natrium, Magnesium und Mangan in den biotischen Proben demonstrieren, dass die Verwitterung durch die Anwesenheit von Mikroorganismen verstärkt wird.

Die Auflösung der Minerale erfolgt logischerweise an der Grenzfläche zwischen dem Gestein und der Umwelt, wobei es sich entweder um die Hydro-, die Atmo- oder die Biosphäre handelt. Im Querschnitt durch ein im Experiment eingesetztes Steinkorn müssten im Fall einer Elementauflösung innerhalb eines Minerals Unterschiede in der Elementkonzentration zwischen dem unberührten Zentrum und der angewitterten Grenzfläche vorliegen. Für den Plagioklas wurde eine Grenzflächen-nahe Auflösung von Kalzium beobachtet. Präparate des Zustandes nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Säulen zeigten Unterschiede in der Kalziumkonzentration; während zentral im Gesteinskorn geringe Mengen an Kalzium vorhanden sind, fehlt es an der Oberfläche fast vollständig. Die Natriumkonzentrationen erscheinen allerdings zentral und Grenzflächen-nah sehr ähnlich und

zwar für die Zustände vor und nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Säulen. Die Auflösung von Natrium wurde jedoch in ICP-OES-Analysen sowohl für biotische als auch für abiotische Proben gezeigt, die Werte lagen allerdings deutlich unter denen für Kalzium. Kalzium wird also aus Plagioklasen schneller herausgelöst als Natrium und liegt in verhältnismäßig höheren Konzentrationen im Eluat vor, auch wenn der prozentuale Anteil im Mineral relativ deutlich niedriger ist. Die schnellere Freisetzung von Kalzium könnte dann auch darin resultieren, dass sie über größere Distanzen von der Grenzfläche in das Mineralzentrum nachweisbar ist, während das langsamer freigesetzte Natrium möglicherweise nur in unmittelbarer Nähe zur Grenzfläche herausgelöst wurde und somit durch die räumliche Auflösung der REM-Technik nicht nachweisbar ist. Vergleichende Untersuchungen wurden mit reinem Albit vorgenommen. Die Kalziumauflösung im Albit lässt sich ähnlich wie für den Albit-ähnlichen Plagioklas im Granit sowohl anhand der ICP/MS-OES- als auch anhand der REM-EDS-Daten zeigen. Die zusätzliche Auflösung von Natrium konnte ebenfalls wie für den Plagioklas im Granit nur über die Eluate, nicht aber über die mineralischen Präparate nachgewiesen werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich mittels TEM-Analysen die Auslaugung der entsprechenden Elemente in mineralogischen Präparaten nachweisen lassen.

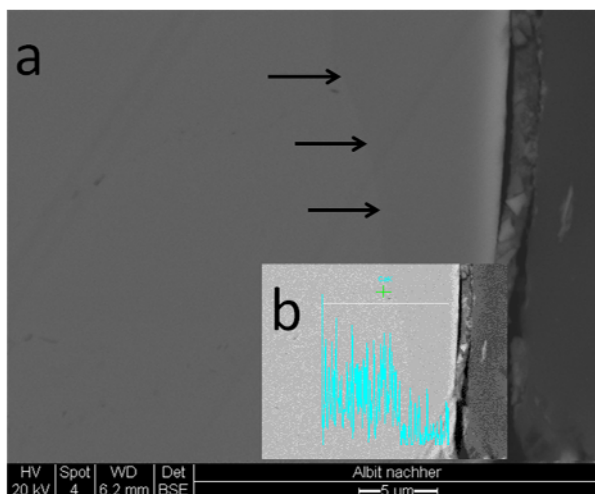


Abb.5: (a) REM-Aufnahme eines Anschliffpräparats eines Albits nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in Durchfluss-Verwitterungsexperimenten. Im Randbereich ist ein dunklerer Streifen erkennbar, der sich scharf von dem zentralen Bereich abgrenzt (markiert durch schwarze Pfeile) und zwischen 5 und 10 µm von der Grenzfläche zwischen Präparat und Umgebung in das Gestein hineinreicht. (b) Eine Kalziummessung im Strichrasterverfahren entlang der Linie von der Grenzfläche zur Umgebung zum Übergang von der dunkleren in die hellere Phase zeigt, dass die Kalziumkonzentration innerhalb des dunkleren Bereichs relativ niedriger ist und beim Übergang zum helleren Bereich sprunghaft ansteigt.

Fazit

Bei dem Vergleich des Wachstums auf verschiedenen Gesteinen mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften stellte sich heraus, dass der Modellbiofilm aus *K. petricola* und *N. punctiforme* je nach Gesteinssubstrat und Witterungsbedingung eine unterschiedliche Morphologie aufwies. EPS-Ausscheidung konnte nur für Zellen von *N. punctiforme* nachgewiesen werden; dabei variiert die Anordnung der EPS in den Biofilmen abhängig vom Gesteinstyp und von den Witterungsbedingungen.

Eine HPLC basierte Nachweismethode für Einfachzucker erlaubt uns in Zukunft die Zusammensetzung der EPS in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen, wie zum Beispiel vom Gestein, Wasserverfügbarkeit, Biofilmpartnern und Quorum sensing Molekülen zu untersuchen.

Die Experimente hinsichtlich der biogenen Verwitterung zeigten, dass einfache Biofilme in den ersten Stadien der Gesteinsbesiedlung quantitativ messbaren Einfluss auf die Verwitterung von Mineralen haben können. Bei dem Vergleich zwischen der nur abiotischen und der auch biotischen Gesteinsverwitterung wurde beobachtet, dass die Organismen bei komplexen Gesteinen wie Granit und bei einfachen Mineralen wie Albit einen signifikanten Einfluss auf die Auflösung bestimmter Elemente haben. Dies konnte auf den Ebenen der gelösten und der Mineralphasen bestätigt werden. Der Mechanismus der Gesteinsauflösung konnte aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse nicht eruiert werden, ein chemischer Angriff durch eine lokale pH-Wert-Erniedrigung zwischen Zellen und Gestein aufgrund von ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten erscheint möglich.