

# **Charakterisierung von Gesteinsbewuchs und -verwitterung durch einen Modellbiofilm**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Franz Seiffert

aus Berlin

im September 2014

Die Arbeit wurde vom 15.02.2011 bis zum 31.08.2014 unter der Leitung von Prof. Anna A. Gorbushina an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Rillig

2. Gutachter: Prof. Dr. Anna A. Gorbushina

Disputation am 16.12.2014

Ich widme diese Arbeit meiner verstorbenen Großmutter Edith Seiffert

„Auf der Suche nach Wissen muss man auf unbestimmte Zeit mit dem Nichtwissen leben können.“

(Erwin Schrödinger, 1887-1961)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, ohne die die hier vorgestellte Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst danke ich Prof. Dr. Anna A. Gorbushina dafür, dass ich meine Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte sowie für ihre wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Ich danke Prof. Dr. Matthias Rillig dafür, dass er sich bereit erklärt hat, der Erstgutachter meiner Arbeit zu sein.

Ich danke Dr. Ralf Milke für seine Unterstützung bei der mineralogischen Analyse meiner Präparate, bei der Herstellung von in meinen Experimenten eingesetzten Mineralen sowie bei den wissenschaftlichen Diskussionen meiner Ergebnisse. An dieser Stelle sei auch seinem Team für die Unterstützung in vielen technischen Fragen gedankt.

Ich danke Prof. Dr. Friedhelm von Blanckenburg, Dr. Julien Bouchez und Dr. Jan Schüssler für die Unterstützung bei der Planung und geochemischen Auswertung von Experimenten zur biotisch induzierten Verwitterung einzelner Minerale.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Franz Simon, Dr. Ute Kalbe und Dr. Nicole Bandow für die Unterstützung bei der Planung von Experimenten zur biotisch induzierten Verwitterung von Granit und der wissenschaftlichen Diskussion meiner Ergebnisse. Frau Renate Helm, Frau Kerstin Erdmann und Frau Katja Nordhauß sei ebenfalls für die technische Unterstützung gedankt.

Ich danke Dr. Thomas Neu und Ute Kuhlicke für die Unterstützung bei mikroskopischen Analysen von Gesteinsbiofilmen mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.

Ich möchte mich zudem ganz herzlich bei den Mitarbeitern Dr. Jörg Toepel, Dr. Nicole Knabe, Dr. Steffi Noack-Schönmann, Dr. Pedro Martín-Sánchez, Serap Avci, Romy Breitenbach, Corrado Nai und Ronald Banasiak aus der Arbeitsgruppe „Modellbiofilme in der Materialkunde“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Auch sämtlichen Mitarbeitern des Fachbereichs 4.1 sei an dieser Stelle gedankt.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, welche mir stets in allen Dingen abseits meiner wissenschaftlichen Arbeit zur Seite standen und mir dadurch diese erleichterten.

## Zusammenfassung

Natürliche Gesteinsformationen und von Menschen aus Gesteinsmaterial erschaffene Gebäude oder Monumente werden bei genügend langer Inkubation von zahlreichen Mikroorganismen besiedelt, welche komplexe Ökosysteme bilden. Dies führt oft zu Verfärbungen der Gesteinsoberflächen durch Pigmente der Mikroorganismen. Zudem können die Organismen das Gestein angreifen und zusammen mit abiotischen Faktoren eine Auflösung herbeiführen, was von essenzieller Bedeutung für die Bildung von Böden und gleichzeitig kritisch für die Erhaltung von Kulturgütern ist. Ein profundes Verständnis der Primärbesiedlung auf Gesteinen ist eine Voraussetzung, um Prozesse der Sukzession und der Gesteinsverwitterung besser nachvollziehen und modellieren zu können. Mischkulturen, die aus dem phototrophen Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 und dem mikrokolonialen Ascomycet *Knufia petricola* CBS 726.95 bestanden, wurden als Modell für die ersten Schritte der Gesteinsbesiedlung in Form von Biofilmen und hinsichtlich des biologischen Einflusses auf die Gesteinsverwitterung hin getestet. Dazu wurden unterschiedliche Gesteine als Substrate angeboten, unter verschiedenen Kultivierungs- und Witterungsbedingungen mit den Mischkulturen inkubiert und die sich bildenden Biofilme bzgl. ihrer Morphologie und Abundanz hin analysiert. Es zeigte sich, dass das Wachstum der Biofilme deutlich von den verwendeten Gesteinen und Witterungsbedingungen abhing und die Anordnung und Morphologie der Zellen und der aus diesen ausgeschiedenen polymeren Substanzen innerhalb der Biofilme sich je nach eingesetztem Gesteinssubstrat deutlich unterschieden. Der biologische Einfluss auf die Verwitterung von Gestein wurde in einem Durchfluss-System an einem Granit und in Batch-Kulturen an Calcit, Forsterit und Olivin getestet, indem nach Inkubation für 45-180 d in An- und Abwesenheit der Mikroorganismen die in der Flüssigphase angereicherten Elemente und die chemischen Veränderungen in der Mineralphase vergleichend gemessen wurden. Dabei zeigte sich, dass der Biofilm die Auflösung von Calcium, Natrium, Magnesium und Mangan aus Granit sowie von Magnesium aus Forsterit und Olivin verstärkte. In einigen Experimenten wurden biotische Effekte von Misch- und Einzelkulturen in verschiedenen Ansätzen verglichen. Einzelkulturen von *K. petricola* und Mischkulturen führten zu verstärkter Magnesiumauflösung, Einzelkulturen von *N. punctiforme* zeigten die gleichen Effekte wie abiotische Kontrollen. Beide Mikroorganismen wuchsen deutlich besser in Mischkulturen, sodass ein indirekter biotischer Effekt auf die Mineralauflösung von *N. punctiforme* durch die Verstärkung des Wachstums von *K. petricola* innerhalb einer mutualistischen Gemeinschaft als plausibel erscheint. Der Mechanismus der biotisch induziert verstärkten Gesteinsverwitterung konnte aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse nicht eruiert werden. Die verwendeten Mischkulturen aus *K.*

*petricola* und *N. punctiforme* konnten als nützliches Modell zur Untersuchung von Gesteinsbewuchs und -verwitterung etabliert werden.

## Summary

Natural rock formations and buildings or monuments constructed by mankind with rock materials are colonised by various microorganisms within complex ecosystems if incubated for sufficient periods of time. This often causes discolouration of rock surfaces by microbial pigments. Microorganisms can also attack the rocks and give rise to their decomposition in combination with abiotic factors being of essential importance for soil formation and critical to the conservation of cultural heritage. For the comprehension and modelling of processes like succession and rock weathering, a profound understanding of primary colonisation is required. Mixed cultures consisting of the phototrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 and the microcolonial ascomycete *Knufia petricola* CBS 726.95 were used as a model to study the first steps of rock colonisation by biofilms and the biotic influence on rock weathering. For that purpose different rocks were offered as substrates, incubation with mixed cultures was done under differing cultivation and atmospheric conditions and forming biofilms were analysed for their morphology and abundance. Results indicate that growth of the biofilms depended precisely on the offered rock substrates and atmospheric conditions. Arrangement and morphology of cells and their excreted polymeric substances within biofilms differed depending on the rock substrate. The biological influence on rock weathering was examined in a percolation system for granite and in batch cultures for calcite, forsterite and olivine. After incubation for 45-180 d with and without microorganisms accumulated elements within the liquid phase and chemical changes within the mineral phase were measured comparatively. Results indicate that dissolution of calcium, sodium, magnesium and manganese from granite and magnesium from forsterite and olivine were enhanced in the presence of the biofilm. For some mineral experiments, biotic effects of mixed and single cultures were distinguished. *K. petricola* single cultures and mixed cultures enhanced magnesium dissolution, *N. punctiforme* single cultures showed effects comparable to the abiotic controls. Both microorganisms grew better within mixed cultures, suggesting an indirect biotic effect of *N. punctiforme* for mineral dissolution, acting as growth enhancing factor for *K. petricola* within mutualistic biofilms. The mechanism of biotically increased rock weathering could not be determined by the here presented results. Mixed cultures of *K. petricola* and *N. punctiforme* could be established as a useful model to study colonisation and weathering of rocks.



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	13
1.1 Gesteinsverwitterung.....	13
1.1.1 Gesteinsverwitterung generell .....	13
1.1.2 Stand der Forschung biotisch induzierter Verwitterung .....	21
1.1.3 Quantifizierung von Verwitterung.....	22
1.2 Biofilme auf Gesteinen .....	25
1.2.1 Biofilme generell .....	25
1.2.2 Biofilme und ihre Sukzession auf Gesteinsformationen .....	26
1.3 Ein Modellbiofilm .....	33
1.3.1 <i>Nostoc punctiforme</i> .....	33
1.3.2 <i>Knufia petricola</i> .....	34
1.3.3 Fakultative Symbiose.....	34
1.4 Ziele der Arbeit .....	34
2.1 Material.....	35
2.1.1 Gesteinsmaterial .....	35
2.1.1.1 Experimente zum Gesteinsbewuchs und zur Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen.....	35
2.1.1.2 Experimente zur Granitverwitterung.....	37
2.1.1.3 Experimente zur Verwitterung einzelner Minerale .....	38
2.1.2 Biologisches Material .....	38
2.1.3 Verwendete Chemikalien .....	39
2.1.3.1 Chemikalienliste .....	39
2.1.3.2 Rezepte für verwendete Lösungen/Medien .....	41
2.1.4 Verwendete Geräte und Materialien .....	45
2.1.4.1 Allgemein verwendete Geräte.....	45

2.1.4.2 Allgemein verwendete Labormaterialien .....	46
2.1.4.3 Verwendete Geräte und Materialien für Versuche zum Gesteinsbewuchs unter variierenden Bedingungen .....	47
2.1.4.4 Verwendete Geräte und Materialien für Versuche zur Gesteinsverwitterung .	47
2.2 Methoden .....	48
2.2.1 Generelle Methoden .....	48
2.2.2 Wachstumsexperimente auf BG11/BG11 <sub>0</sub> Festmedium.....	54
2.2.3 Gesteinsbewuchs unter variierenden Witterungsbedingungen .....	55
2.2.3.1 Wachstum in Schüttelkultur bei unterschiedlichen Temperaturen .....	56
2.2.3.2 Wachstum unter dis- und semikontinuierlichen Bedingungen .....	56
2.2.4 Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen .....	67
2.2.5 Verwitterung von Gesteinen .....	68
2.2.5.1 Verwitterung von Granit, Albit und Mikroklin .....	68
2.2.5.2 Verwitterung einzelner Minerale.....	75
3. Ergebnisse und Diskussion.....	79
3.1 Wachstum des Modellbiofilms auf Nährmedium .....	79
3.2 Gesteinsbewuchs unter variierenden Witterungsbedingungen .....	84
3.3 Gesteinsverwitterung.....	101
3.3.1 Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen .....	101
3.3.2 Verwitterung von Granit .....	104
3.3.3 Verwitterung einzelner Minerale .....	130
4. Fazit und Ausblick.....	139
5. Literaturverzeichnis.....	142
6 Anhang.....	158
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	158
6.2 Publikationen.....	164

6.2.1 Publikationen in Fachzeitschriften .....	164
6.2.2 Konferenzbeiträge .....	164



# 1. Einleitung

Mikrobielles Wachstum auf Gesteinen spielt bei der Besiedlung von Kulturgütern eine wichtige Rolle, was in besonderem Maß hinsichtlich des Bewuchses von Monumenten bekannt ist [1-5]. Relevant ist dabei in erster Linie der biologische Einfluss auf die Ästhetik z.B. durch die Verfärbung von Gebäudewänden seitens der Mikroorganismen [6-10]. Durch die Ausscheidung saurer Stoffwechselprodukte und aktives Wachstum in Substrate hinein können Gesteine auch direkt geschädigt werden [11-20], was als Biodeterioration bezeichnet wird. Um die Mechanismen dieser Biodeterioration und der vorausgehenden Primärbesiedlung besser verstehen zu können, wird ein vereinfachtes Modell aus zwei Mikroorganismen untersucht, die typische Vertreter auf Gesteinen in den ersten Bewuchsstadien sind.

## 1.1 Gesteinsverwitterung

Unter dem Begriff Gesteinsverwitterung werden alle Prozesse zusammengefasst, die eine Zersetzung oder Veränderung von Gesteinen bewirken [21]. Das ursprüngliche Erdmaterial wird dabei durch Prozesse an der Oberfläche in Regolith transformiert [21]. Die Verwitterung von Gestein ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung von Böden [22, 23] und man geht aktuell davon aus, dass mikrobieller Bewuchs dafür eine wichtige Rolle spielt [21, 24-26]. Die Mechanismen sind dabei chemischer und physikalischer Natur und können sowohl durch die belebte als auch durch die unbelebte Umwelt verursacht werden. In der Arbeit wird daher zwischen physikalischer und chemischer sowie zwischen abiotischer und biotischer Gesteinsverwitterung unterschieden.

### 1.1.1 Gesteinsverwitterung generell

Die Prozesse der Gesteinsverwitterung finden an den Grenzflächen zwischen der Litho- und der Atmo- bzw. der Hydrosphäre statt. Unter Lithosphäre wird die Gesamtheit aller auf der Erde vorkommenden Gesteine bezeichnet, sie umfasst die Erdkruste und den äußersten Teil des Erdmantels; ein Gestein besteht, laut geologischer Definition, aus massiver, fester, anorganischer Materie aus üblicherweise zwei oder mehr zusammenhängenden Mineralen [27]. Die Atmosphäre enthält ein Gasgemisch, das sich im Lauf der Evolution stark verändert hat und heute zu etwa 78% aus N<sub>2</sub>, zu 21% aus O<sub>2</sub>, zu 0,9% aus Ar und weiterhin aus Aerosolen und Spurengasen (unter anderem CO<sub>2</sub> und Wasser) besteht [28]; Aerosole sind

Gemische aus festen oder flüssigen Schwebeteilchen organischer oder mineralischer Herkunft mit einem Gas. Die Hydrosphäre umfasst die Gesamtheit des Wassers auf der Erde und enthält zudem gelöste Teilchen organischer oder mineralischer Herkunft [29]. Leben kommt in der Atmosphäre, der Hydrosphäre und dem obersten Teil der Erdkruste vor; dies wird demnach als Biosphäre bezeichnet [30]. Physikalische und chemische Gesteinsverwitterung kann an den Grenzflächen von Atmo-, Hydro- und Biosphäre mit der Lithosphäre stattfinden, Formen dieser zwei fundamentalen Kategorien von Verwitterung werden im Folgenden vorgestellt.

### **Physikalische Verwitterung**

Physikalische Faktoren umfassen Temperatur, Sonneneinstrahlung, Feuchte und Druck. Physikalische Verwitterung tritt demnach in Folge von extremen Temperaturen und damit verbundener thermischer Expansion, Temperaturschwankungen, Gefrier-Tauzyklen, Schwankungen von Luftdruck und -feuchte und damit verbundener Erosion durch Regen und Wind sowie in Form mechanischer Drücke - verursacht z.B. durch Mikroorganismen oder Pflanzenwurzeln - auf [31]. Ein zusätzlicher Fall physikalischer Verwitterung ist die Salzverwitterung [32].

Längere Inkubation bei erhöhten Temperaturen kann eine Ausdehnung von Gesteinen bewirken, was als thermische Expansion bezeichnet wird [33]. Ein zunehmender Verlust an Kohäsion entlang der Korngrenzen innerhalb des Gesteins wird als initialer Schritt dieses Prozesses gesehen. Ausrichtung und Intensität der thermischen Expansion sind abhängig von der Stärke der jeweiligen Kristallgitter der Minerale [33]. Temperaturstress kann durch die gleichen Mechanismen auch eine veränderte Porosität verursachen [34]; ebenso können auf diese Weise Mikrorisse innerhalb des Gesteins entstehen [35]. Im Zuge der Klimaerwärmung kann thermischer Stress auf Baustoffe dramatisch an Bedeutung gewinnen, besonders hinsichtlich der in vielen historischen Monumenten verwendeten Natursteine [36].

Starke Temperaturschwankungen werden durch tageszeitliche Veränderungen im Einfall der Sonneneinstrahlung verursacht; man spricht in diesem Zusammenhang von Insolationsverwitterung [37]. Dieser Verwitterungstyp ist besonders an Orten mit sehr aridem Klima wie z.B. Wüsten relevant [38]. Phänomene sind Temperatursprengungen bzw. Kernsprünge und Abschuppungen. Kernsprünge sind radial verlaufende Klüfte im Gestein; sie entstehen dadurch, dass sich die durch Insolation verursachten Zyklen von Expansion und Kontraktion deutlich stärker an der Oberfläche als im Gesteinsinneren ausbilden, was auf abfallende Temperaturgradienten von der Oberfläche zum Inneren hin zurückzuführen ist. Dadurch entstehen Spannungen im Gestein, die zu einer Schwächung des

Gesteinsverbunds und schließlich zu dessen Sprengung führen können. Abschuppung bzw. Desquamation bezeichnet das Loslösen schaliger Gesteinsplatten von Felswänden.

Gefrier-Tauzyklen treten überall auf, wo flüssiges Wasser verfügbar ist und aufgrund klimatischer Standortbedingungen regelmäßig seinen Aggregatzustand zwischen fest und flüssig wechselt. Verwitterungseffekte, die durch solche Gefrier-Tauzyklen verursacht werden, sind in der Literatur gut beschrieben [39-41]. Wasser gefriert unter idealen Bedingungen bei 0°C, sofern sich Kristallisationskeime bilden können, die der Ursprung wachsender Eiskristalle sind [42]. Mit dem Gefrieren setzt aufgrund der Anomalie des Wassers eine Volumenzunahme ein; dies kann in Gesteinsporen einen mechanischen Druck ausüben [41]. Andere Hypothesen gehen davon aus, dass der durch Gefrieren verursachte physikalische Stress durch die heterogene Eiskristallbildung in unterschiedlichen Poren herrührt. Während in größeren Poren das Wasser bereits früher in den festen Zustand übergeht, kann es in kleineren Poren noch in flüssiger Form vorliegen; bewegt sich Wasser aus kleineren Poren bzw. ungefrorenen Arealen hin zu wachsenden Eiskristallen, kann dies zu kapillarischen und hydraulischen Drücken und damit zu physikalischem Stress führen [41]. Wiederholte Zyklen von Gefrieren und Tauen können so die Bildung von Mikrorissen und auch Frostsprengungen zur Folge haben [40]. Beim Vergleich von Trocknungs-Befeuchtungszyklen ohne ein Einfrieren mit Gefrier-Tauzyklen zeigte sich, dass der Wechsel von Trocknung und Befeuchtung für die Materialschädigung von größerer Bedeutung ist als das Einfrieren *per se* [39].

Wind entsteht in der Atmosphäre durch die Änderung von Luftdrücken, was von der Kondensation und Evaporation von Wasser beeinflusst wird [43]. Der primäre Effekt der Winderosion entsteht durch Abreibung an den Gesteinsoberflächen durch Partikel, die mit dem Wind transportiert werden [44]. Sehr kleine Partikel mit Größen von <100 µm haben eher einen verschmutzenden als einen abreibenden Effekt, Partikel mit Größen von >1 mm können durch den Wind nicht mehr im gleichen Maß transportiert werden. Die abreibenden, windübertragenen Partikel haben demnach meist eine Korngröße von 100-600 µm [44]. Die Bildung von Alveolen-artigen Strukturen wird oft indirekt durch Wind verursacht und als Wabenverwitterung bezeichnet [45]. Dabei werden Bindungen zwischen einzelnen Körnern meist durch andere Faktoren wie z.B. Regenwasser oder Trocknungs-Befeuchtungszyklen gelöst; ist Restfeuchtigkeit vorhanden, kann diese die gelockerten Körner durch adhäsive Kräfte zusammenhalten, sodass erst der Wind, welcher die Feuchtigkeit entfernt, zum Ende des Zusammenhalts führt und irrtümlicherweise als proximaler Grund angesehen wird [44].

Wasser kann auf verschiedene Arten physikalische Verwitterung verursachen. Die relative Luftfeuchte spielt dabei eine entscheidende Rolle; erreicht sie den Wert von 100%, liegt eine

Sättigung vor und man spricht vom Taupunkt, an dem eine Kondensation von Wasser erfolgt [44]. Die Kondensation von Wasser kann in der Atmosphäre, an der Oberfläche oder in den Poren von Gesteinen stattfinden. Die physikalisch-chemischen Bedingungen sind jeweils sehr unterschiedlich: während Wasser in Tropfen in der Atmosphäre komplett flüssig vorliegt, ist dies innerhalb von Gesteinsporen nicht gegeben; ein Teil des Wassers liegt in gebundener und adsorbierter Form, ein anderer in flüssiger Form vor. Da zudem auch noch Ionen aus dem Gesteinsmaterial in Lösung vorliegen können, findet eine Kondensation schon bei relativen Luftfeuchten von <100% statt.

Das in oder auf Gesteinen kondensierende Wasser kann zu einer partiellen Auflösung der jeweiligen Materialmatrix führen. Kondensations-Evaporationszyklen können eine Migration von Salzen verursachen, indem diese an bestimmten Stellen aufgelöst werden und an anderen erneut kristallisieren. Das kann zur Schwächung des Materials führen. Wasser kann weiterhin, wie z.B. in Tonmineralen, die Struktur des Materials ändern und somit für Expansion und Risse im Gestein sorgen: Wassermoleküle dringen dabei zunächst in das Kristallgitter ein und verursachen eine Schwellung des Minerals und unter Umständen die Bildung neuer Kristallstrukturen; evaporiert das adsorbierte Wasser aus den Kristallen, kommt es zu Kontraktionen, die hysteretisch ablaufen [46]. Adsorptions-Evaporationszyklen des Wassers können dann zu irreversiblen Schäden führen. Wasserfilme auf Oberflächen erniedrigen nicht nur die freie Oberflächenenergie des Materials und schwächen es somit, sie erleichtern ebenso die Deposition von Aerosolen, da letztere beim Kontakt mit der Materialoberfläche ohne Rückpralleffekte leichter anhaften [44].

Das in der Atmosphäre kondensierende Wasser fällt als Tropfen in Form von Regen auf die Hydro- oder Lithosphäre. Es kann im Fall der Hydrosphäre die Ozeane oder auch Fließgewässer speisen und dann über die Prozesse der Sedimentation und Erosion Gesteine bzw. Mineralien absetzen oder abtragen. Der Prozess der Wassererosion besteht darin, dass Gesteinspartikel mobilisiert und durch den Wasserstrom an andere Positionen transportiert werden [27]; er findet hauptsächlich über Fließgewässer statt, meist zusammen mit chemischen Verwitterungsfaktoren. Das Absetzen mobilisierter Partikel bzw. neu präzipitierter Minerale findet bei der Sedimentation statt. Treffen Regentropfen direkt auf die Lithosphäre, kann das Wasser durch den Aufprall in mechanischer Form auf die Gesteine wirken oder in Kapillaren und Poren innerhalb der Gesteine eindringen; letzterer Fall ist allerdings nur möglich, wenn die gesamte interne und externe Gesteinsoberfläche mit einer Einzel- oder Doppelschicht von Wassermolekülen benetzt ist [44]. Zusätzlich kann das Wasser Partikel aus der Atmosphäre übertragen oder mit Partikeln, die durch andere Mechanismen auf die Gesteinsoberflächen gelangt sind, reagieren, worauf bei den chemischen Verwitterungsfaktoren eingegangen wird.

Salzverwitterung kann durch folgende Mechanismen vorangetrieben werden [32]: Kristallisation von Salzen in Gesteinsporen übt Druck auf die Wände der Poren aus und kann diese damit schädigen. Zusätzlich können Salze indirekt auch osmotisch bedingtes Aufquellen von Lehmen und Tonen, thermische Expansion, Hydratationsdruck und verstärkte Gefrier-Tau-Zyklen verursachen. Eine durch Salzkristallisation verursachte Verwitterung kann zu der Bildung von Alveolen- oder Waben-artigen Mustern führen [47].

Auch die belebte Umwelt kann zahlreiche Formen von physikalischem Stress auf Gesteine ausüben. Wenn man von anthropogenen Einflüssen z.B. in Steinbrüchen absieht, gehen die relevanten biotischen Verwitterungseffekte physikalischer Natur von Pflanzen und Mikroorganismen aus [48-52]. Die hierbei vorliegenden Mechanismen sind besonders gut für Flechten [50] und Pilze [51-53] beschrieben.

Hyphen von Pilzen und innerhalb von Flechten können in bereits vorhandene Poren im Gestein penetrieren [50, 52]. Durch diese aktive Bewegung üben Hyphen einen mechanischen Druck auf die Gesteinswände innerhalb der Poren aus und können zu einer Disaggregation und Ablösung einzelner Mineralkörner im Gesamtgefüge führen [54]. Die Penetration kann in horizontaler und vertikaler Richtung sowohl in intergranulären Freiräumen als auch in den Schieferungsflächen zwischen unterschiedlichen Mineralphasen erfolgen, wie es für Granite zwischen Glimmer- und Feldspatphasen beschrieben wurde [55]. Die Penetration zwischen Schieferungsflächen kann zu einer Ablösung einer Mineralphasenschicht führen, wie für Glimmerschichten in Granit beschrieben [56]. Ein Abblättern von Biotit-haltigen Schichten konnte im direkten Einflussbereich epilithischer Flechtenbesiedlung gezeigt werden [57]. Zudem können Einkerbungen an der Oberfläche von Gesteinen durch Hyphen und die Entwicklung von Fruchtkörpern induziert werden [50]; oft sind Einkerbungen auch auf eine Kombination von physikalischen und chemischen Faktoren zurückzuführen. Sterflinger beschreibt die einzelnen Schritte der Penetration durch Pilzhypen folgendermaßen [52]: Zunächst haften sich Pilze über Appressorien sehr fest an die Gesteinsoberflächen an; anschließend dringen dünne Hyphen über jegliche Art von Diskontinuität zwischen den Kristallen der Minerale in das Innere des Gesteins ein. Über Kapillaren-artige Strukturen wie Risse gelangen die Hyphen in größere innere Poren, wo sich neue Pilzkolonien bilden, die ihrerseits weitere Hyphen in alle Richtungen aussenden. Damit verbundene starke Änderungen des internen Drucks können zur Lockerung von Kristallen und schließlich zu deren Zusammenfallen führen. Dieser aus Penetration, Dekohäsion und Materialverlust kombinierte Prozess ist progressiv, da die Pilze immer tiefer und verzweigter in das Gestein eindringen. Auf diese Weise können Einkerbungen mit einem Durchmesser von 2 cm entstehen [58].

Ein weiterer Effekt durch Flechten ist auf die Ausdehnung und Kontraktion der Thalli - verursacht durch alternierende Wechsel von Feuchte und Trockenheit - zurückzuführen [50]. Die Flechtenmedulla besteht aus klebrigen, gallertartigen Substanzen und ist stark hygroskopisch; bei genügend hoher Luftfeuchte können bis zu 300% des Trockengewichts an Wasser aufgenommen werden, was mit einer starken Volumenzunahme verbunden sein kann. Zyklen solcher Ausdehnungen und Kontraktionen können demnach das Gestein in ähnlicher Weise wie Trocknungs-Befeuchtungszyklen attackieren, was zu sichtbaren Schädigungen innerhalb von zehn Jahren führen kann, wie für Denkmäler in Zentralitalien beschrieben wurde [59].

Gefrier-Tauzyklen spielen auch im Zusammenhang mit Flechten, vor allem in alpinen Zonen, eine Rolle bzgl. der Gesteinsverwitterung [50]. Der Mechanismus der Schädigung ist dabei ähnlich wie für den abiotischen Fall beschrieben, wobei hier nicht reines Wasser sondern die Flüssigkeit der einzelnen Zellen im Flechtenthallus bzw. auch Flüssigkeit in der direkten Mikroumgebung den Gefrier-Tauzyklen unterworfen ist. Bei bewachsenen Gesteinen liegt natürlich meist eine Kombination abiotisch und biotisch verursachter Gefrier-Tauzyklen vor.

Für Flechten konnte auch gezeigt werden, dass teilweise eine Inkorporation von Mineralfragmenten in den Flechtenthallus stattfindet; so wurde an Grenzflächen zwischen Thalli von *Parmelia conspersa* und Granit beobachtet, dass Teile des selben Mineralpartikels inner- und außerhalb des Flechtenthallus vorlagen [60].

Bestimmte Organismen besitzen eine Pigmentierung mit stark licht absorbierenden Eigenschaften; wachsen sie auf weißen Gesteinen, kann dies je nach Bewuchs zu einer selektiven Absorption von Sonneneinstrahlung führen und bewirken, dass aufgrund von lokalen Kristallausdehnungen Unregelmäßigkeiten im Gesamtgefüge bis hin zu Kristalldekoherenzen entstehen [52].

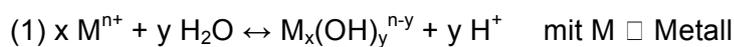
Physikalische Verwitterungsfaktoren *per se* führen zu keiner Änderung der Elementzusammensetzung innerhalb von Mineralen. Eine solche Änderung wird durch chemische Verwitterung verursacht.

### **Chemische Verwitterung**

Chemische Faktoren der Gesteinsverwitterung sind Moleküle bzw. Stoffe organischer oder anorganischer Natur, welche sich in der Atmo-, Hydro- oder auch Biosphäre befinden und durch chemische Reaktionen Veränderungen in der Lithosphäre hervorrufen. Die Veränderungen äußern sich in Hydratation, Hydrolyse, Oxidation und Präzipitation der entsprechenden Minerale.

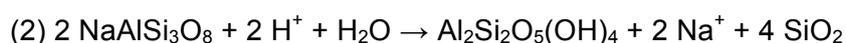
Minerale werden normalerweise als anorganische Komponenten mit spezifischer chemischer Komposition und Struktur definiert, die üblicherweise kristallin, selten amorph sind [27]. Minerale, die durch die Abkühlung von Magma aus dem Erdinneren entstehen, werden Primärminerale genannt; aus den Primärmineralen können durch chemische Verwitterung bzw. Diagenese Sekundärminerale entstehen [27].

Viele Minerale bestehen aus Metallen und Nichtmetallen und bilden ionische Bindungen zwischen Metall-Kationen und Nichtmetall-Anionen aus. Metallionen hydrolysieren normalerweise in polaren Lösungsmitteln wie Wasser unter Bildung von mono- und polynukleären Hydroxylkomplexen [61], entsprechend Reaktionsgleichung (1):



Diese Reaktion beruht auf den Dipoleigenschaften des Wassers und führt zu der Auflösung von Mineralen in die ionischen Einzelbestandteile. Ob und wie stark eine solche Hydrolyse stattfindet, hängt von der Elektrolytstärke des gelösten Stoffes, dem Lösungsmittel und die Reaktionskinetik bestimmenden Faktoren wie pH-Wert und Temperatur ab [49, 62, 63]. Je stärker ein Elektrolyt ist, desto größer ist sein in ionisierter Form vorliegender Anteil in Lösung, wobei die Elektrolytstärke selbst lösungsmittelabhängig ist [63]. Aufgrund des Löslichkeitsprodukts des jeweiligen Elektrolyts tritt zudem bei einer spezifischen Konzentration eine Lösungssättigung auf, die eine weitere Dissoziation der Elektrolyte verhindert [63].

Während der Hydrolysereaktion werden einzelne Positionen in den Kristallgittern der Minerale frei und somit die Kristallgitter geschwächt. Der Reaktionsmechanismus beruht auf der Anlagerung geladener Positionen in den Dipolen des Wassers an geladene Ionen des Kristallgitters und kann durch geladene Teilchen im Lösungsmittel wie z.B.  $H^+$ / $OH^-$ -Ionen verstärkt werden; ein saures Milieu führt zu einem Anstieg der  $H^+$ -Ionen-Konzentration und kann somit die Verwitterung beeinflussen. Eine typische hydrolysierende Verwitterungsreaktion ist in Gleichung (2) gezeigt, wo das Primärmineral Albit sich bei sauren Bedingungen unter Auflösung der Natriumionen zum Sekundärmineral Kaolinit hin verändert (nach [64]):



Die Auflösung erfolgt hierbei partiell; eine vollständige Auflösung ohne die Bildung von Sekundärmineralen erfolgt normalerweise eher bei Evaporiten und reinen Carbonaten [49].

Die Veränderung der Minerale kann nicht nur durch partielle Auflösung sondern auch durch den Austausch von herausgelösten Metallen durch Wasser oder neue Metalle erfolgen, die

an den erzeugten Freistellen im Kristallgitter eingebaut werden. Die Bildung von Sekundärmineralen hängt daher auch von der hydrogeochemischen Umgebung ab. Das Herauslösen von Metallen aus Mineralen ist abhängig von der Valenz der entsprechenden Metalle, was in unterschiedlichen Kinetiken und Auflösemechanismen für verschiedene Minerale resultiert [65].

Ein weiterer chemischer Faktor neben der Hydrolyse ist die Hydratation, die durch die Bildung hydrierter Schichten innerhalb von Mineralen zu deren Auflösung beitragen kann [66]. Dabei treten beide chemischen Prozesse konzertierend auf, da eine anfängliche Hydrolyse den Einbau von Wasser in das Kristallgitter ermöglicht und letzterer das Gitter schwächen kann und somit einer weiteren Hydrolyse zugänglich macht [66].

Die Oxidation von Mineralen erfolgt durch einen Elektronenakzeptor, welcher die Elektronen von einem bestimmten Element des Minerals aufnimmt und dessen Oxidationsstatus erhöht. Ein solcher Austausch von Elektronen verändert die Kristallstruktur wie z.B. im Fall des Wechsels von  $\text{Fe(II)O}$  zu  $\text{Fe(III)O}_{1,5}$ , der mit einer Vergrößerung an Molekülvolumen einhergeht. Oxidationen zahlreicher Elemente spielen bei der Mineralverwitterung eine Rolle [67-69]; sie sind von der Anwesenheit geeigneter Elektronenakzeptoren sowie vom pH-Wert abhängig [69, 70].

Präzipitation bezeichnet den Umkehrprozess der Auflösung; hier bilden die entsprechenden, gelösten Ionen durch Bildung einer festen Kristallstruktur ein Mineral. Präzipitationsreaktionen laufen normalerweise ab, wenn das Löslichkeitsprodukt der entsprechenden Elemente überschritten wird, und sind pH-abhängig [71].

Ablagerungen organischer oder anorganischer Natur können für saure Bedingungen auf Gesteinen sorgen. Aus der Luft übertragene Partikel können entweder mit Wassertropfen in der Atmosphäre reagieren oder sich direkt auf Gesteinen absetzen. Anthropogen bedingt ist der relative Anteil organischer und anorganischer Partikel in der Atmosphäre gestiegen [11]. Verschiedene Stickstoff- und Schwefeloxide können wie  $\text{CO}_2$  durch die Reaktion mit Wasser zur Bildung von Säuren führen und demnach, wenn sie auf Gesteinsoberflächen deponiert werden, unter dem Einfluss von Regen materialschädigend sein [44]. Organisches Material inklusive organischer Säuren gelangt in großem Maße durch die belebte Umwelt auf Gesteinsoberflächen [25]. Die Hauptprozesse biotisch induzierter chemischer Gesteinsverwitterung umfassen die Acidifikation des Gesteins durch die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten bzw. durch Zellatmung, die Mobilisierung von Metallen aus dem Gestein sowie die Deposition biogener Minerale und organischen Materials [25].

Ausscheidungsprodukte von Mikroorganismen beinhalten teilweise anorganische Säuren wie  $\text{HNO}_3$  oder  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , fast immer jedoch organische Säuren wie Citronensäure, Oxalsäure, Essigsäure und viele weitere; letztere werden im Citratzyklus oder anderen Stoffwechselwegen gebildet. Eine Acidifikation findet entweder passiv über die Zellatmung [17] oder über die aktive Exkretion der entsprechenden Säuren statt [18-20, 72, 73]. Da gesteinsbesiedelnde Mikroorganismen meist in Biofilmen oder Kolonien wachsen, kann hier eine Konzentrierung von sauren Stoffwechselprodukten auf einer relativ kleinen Fläche stattfinden und somit den schädigenden Effekt verstärken [25].

Chemische Verwitterung kann in ariden Landschaften auch durch Bio-Alkalisierung von Cyanobakterien verursacht werden [74]. Endolithische Cyanobakterien verursachen dabei eine Alkalisierung des Gesteins während der Photosynthese, was zu einer Lockerung darüber liegender Gesteinsschichten führt. Diese können dann durch physikalische Faktoren wie Wind und Wasser erodiert werden.

Von einigen Mikroorganismen ausgeschiedene Siderophore können Eisen komplexieren und es nach dem Rücktransport in die Zellen diesen verfügbar machen [75]. Bestimmte Mikroorganismen können Metalle aus Metallsulfiden durch mikrobielle Katalyse direkt mobilisieren [25], wodurch Metalle aus den Kristallgittern der Minerale entfernt und letztere geschwächt werden.

Der Mineraldeposition liegen verschiedene Mechanismen zu Grunde. Einerseits kann eine Präzipitation von gelösten Stoffen mikrobiell durch Redox-Reaktions-Prozesse induziert werden; da Minerale dann aus Ionen in Lösung neu entstehen, spricht man von authi- oder neogenen Prozessen. Beispiele sind die Oxidation von gelöstem  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  oder von  $\text{Mn}^{2+}$  zu  $\text{MnO}_2$  [25]. Andererseits kann bereits bestehendes Lockersediment verfestigt werden, was als Diagenese bezeichnet wird. Ein Beispiel ist die mikrobiell unterstützte Apatitbildung aus Carbonat [76, 77]. Auch Algen und Tiere spielen eine Rolle bei der Mineraldeposition; Tiere sind maßgeblich an der Bildung von Calciumcarbonat-haltigen Korallenriffen beteiligt [78] und in Sedimentgesteinen können biogene Silikate und Carbonate gefunden werden, die von vielen unterschiedlichen Organismen gebildet werden [79, 80].

### **1.1.2 Stand der Forschung biotisch induzierter Verwitterung**

Für Organismen aus unterschiedlichen taxonomischen Gruppen wie Pilzen, Flechten, verschiedenen Bakterientypen und sogar Pflanzen konnten Laugungs- bzw. die Verwitterung verstärkende Effekte gezeigt werden [12, 72, 81-87]. Die Analyse der biotischen Effekte

erfolgte dabei oft nur qualitativ. Optische Demonstrationen biotischer Verwitterung umfassen Ätzgruben, wie für *Shewanella oneidensis* auf Calcit [83] oder für Diatomeen auf Glas [86] beschrieben, und den Nachweis von Organismen innerhalb von Gesteinsrissen und induzierter Risse oder Auflockerungen in der Gesteinsmatrix, wie in [16, 88] beschrieben. Quantitative Messungen ausgelaugter Elemente stammen oft aus Studien mit Bodenrelevanten Organismen aus fortgeschrittenen Stadien des Gesteinsbewuchses [81, 87], die Rolle der Primärbesiedler auf Gesteinen ist bisher noch wenig verstanden.

Um das Ausmaß von biotisch und abiotisch induzierter Verwitterung einschätzen zu können, muss es quantifiziert werden. Im Folgenden werden Möglichkeiten der Quantifizierung von Gesteinsverwitterung vorgestellt.

### 1.1.3 Quantifizierung von Verwitterung

Um die Veränderung und Auflösung von Mineralen zu quantifizieren, können das Gestein bzw. die umgebende Flüssigphase untersucht werden. Dabei wird die Situation in einem Experiment *a priori* mit späteren Zeitpunkten verglichen. Die Gasphase kann bzgl. der Quantifizierung von Gesteinsverwitterung vernachlässigt werden.

Die Auflösung von Mineralen lässt sich über die Messung der Elementkonzentrationen im Gestein und in der Flüssigphase durch verschiedene Methoden quantifizieren. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDS) eignet sich zur Analyse der Festphase. Dabei wird eine möglichst ebene, am besten polierte Probe durch einen Elektronenstrahl einheitlicher Energie angeregt und von den Atomen der Probe ausgesendete Röntgenstrahlung gemessen, welche für jedes Element eine spezifische Energie besitzt. Man erhält somit Informationen über die Elementzusammensetzung in der untersuchten Probe [89]. Die laterale Auflösung hängt von dem Elektronenmikroskop ab, welches an den EDS-Detektor gekoppelt ist. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erhöht dabei die Auflösung, welche bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) aufgrund von Streueffekten im niedrigen Mikrometerbereich limitiert sein kann. Die Analyse der Flüssigphase kann über spektrometrische bzw. spektroskopische Methoden mit induktiv gekoppeltem Plasma erfolgen [90]. Dabei werden die Atome innerhalb der Probe auf sehr hohe Temperaturen (5000-10000°C) erhitzt und in ein im Hochfrequenzfeld ionisiertes Gas (Plasma), typischerweise Argon, geleitet. Je nachdem ob die in der Probe enthaltenen Elemente aufgrund ihrer Massen oder ihrer optischen Emission nach Anregung durch sehr heißes Plasma analysiert werden, spricht man von ICP-MS (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) oder ICP-OES (engl. *inductively coupled plasma optical emission*

*spectroscopy*). ICP-MS besitzt niedrigere Nachweisgrenzen als ICP-OES, beide Methoden unterschreiten EDS-basierte bzgl. des Nachweises einzelner Elemente deutlich. Zur Analyse von festen Gesteinsproben per ICP-MS/OES muss das Gestein in die Flüssigphase gebracht und daher aufgeschlossen werden, zum Aufschluss von Gesteinen existieren zahlreiche Verfahren [91-95].

Aus den gemessenen Elementkonzentrationen lassen sich Auflöseraten (Menge aufgelösten Minerals bzw. Elements pro Zeiteinheit) für die entsprechenden Minerale berechnen, was sich besonders für die Analyse der Flüssigphase eignet [64]. Letztere ermöglicht allerdings nur Aussagen über die Netto-Auflöseraten, da aufgelöste Metalle in Sekundärmineralen präzipitieren können und dann nicht mehr in der Flüssigphase gemessen werden. Komplexe Gesteine, die aus vielen verschiedenen Mineralen bestehen, können nur dann bzgl. der Auflöseraten einzelner Minerale über die Flüssigphase evaluiert werden, wenn sich die Minerale in ihrer Zusammensetzung verwitterbarer Elemente unterscheiden. Die Untersuchung von einzelnen Mineralen vereinfacht das experimentelle System und eignet sich daher besonders zur Quantifizierung von Auflöseraten.

Auflöseraten des gleichen Materials unterscheiden sich teilweise deutlich, je nachdem ob sie aus einem Verwitterungsprofil im Feld oder aus Laborexperimenten ermittelt wurden, auch wenn sie auf die spezifische Oberfläche und das Mineral von Interesse normiert wurden [96]. Dies kann verschiedene Zeit-bedingte Gründe haben: Man versucht im Labor, die relativ großen Zeiträume, unter denen Verwitterung natürlicherweise stattfindet, durch eine Vergrößerung der spezifischen Oberfläche im experimentellen Ansatz auszugleichen. Die natürliche Veränderung der Gesteinsoberfläche und der chemischen Umgebung ist über sehr lange Zeiträume viel stärker und damit von deutlich größerer Bedeutung als über relativ kurze Zeiträume wie in Laborexperimenten [97]. Dies wirkt sich auf ermittelte Auflöseraten aus. Für Calcit wurde zudem gezeigt, dass zwischen ermittelten Auflöseraten aus Laborexperimenten Unterschiede im Bereich von Zehnerpotenzen liegen [98]. Ein Problem bei der Berechnung von Auflöseraten ist, dass sich die spezifische Oberfläche während des Auflöseprozesses ständig ändert; weiterhin können unterschiedliche Reaktionsmechanismen mit verschiedenen Kinetiken bei der Auflösung des selben Minerals auftreten, je nachdem ob Ätzgruben auf der Mineraloberfläche vorhanden sind oder nicht [99]. So kann es für die Auflösung des gleichen Minerals bei identischen Temperatur-, pH- und Sättigungsgradwerten zu unterschiedlichen Auflöseraten kommen, abhängig davon, ob die Reaktion sich von einem Zustand, der weit vom Gleichgewichtszustand entfernt ist und daher durch starke Freie Enthalpie-Werte die Bildung von Ätzgruben ermöglicht, dem Gleichgewichtszustand nähert oder ob sie sich zu Beginn nahe dem Gleichgewichtszustand befindet und von diesem entfernt [99]. In letzterem Fall werden sich kleine oder gar keine

Ätzgruben bilden und durch den somit anderen Reaktionsmechanismus verhält sich die Mineralauflösung kinetisch unterschiedlich.

Festphasen des Gesteins werden oft über Verhältnisse von einem oder mehreren mobilen und einem oder mehreren immobilen Elementen in Verwitterungsindices evaluiert [100, 101]. Die unterschiedliche Mobilität von Elementen bedeutet in diesem Zusammenhang ihre relative Tendenz, sich vom ursprünglichen Gesteinsmaterial in die Umgebung zu bewegen. Die Mobilität unterscheidet sich deutlich zwischen verschiedenen Elementen und letztere können in Mobilitätsrangfolgen eingeordnet werden [102]. Verwitterungsindices können in Gruppen eingeteilt werden, je nachdem ob sie nur die Abundanzen mobiler oder auch immobilere Elemente berücksichtigen bzw. ob sie Silizium als immobil betrachten [64]. Um nützlich zu sein, sollten Verwitterungsindices bestimmte Kriterien aufweisen, wie z.B. eine einfache Handhabung und die Berücksichtigung relevanter Elemente mit einer gewissen Bandbreite an Mobilität. Weiterhin sollten sie auf möglichst viele Gesteinstypen anwendbar sein und eine möglichst große Variabilität an möglicher Verwitterung aufnehmen können [100]. Der Verwitterungsindex WIP nach Parker [103] erfüllt viele der erforderlichen Kriterien und lässt sich für viele Gesteinstypen verwenden [100]. Er ist in Gleichung (3) definiert.

$$(3) \text{ WIP} = 100 * [(2 \text{ Na}_2\text{O}/0,35) + (\text{MgO}/0,9) + (2 \text{ K}_2\text{O}/0,25) + (\text{CaO}/0,7)]$$

Der WIP-Index berücksichtigt allerdings keine immobilere Elemente; im weithin akzeptierten CIA-Index nach Nesbitt & Young [104], der in Gleichung (4) definiert ist, wird Aluminium als immobil definiert.

$$(4) \text{ CIA} = 100 * [\text{Al}_2\text{O}_3/(\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{CaO} + \text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O})]$$

Die Ermittlung des WIP- und des CIA-Index führt zu einer guten Einschätzung des Verwitterungszustandes eines Gesteins.

Die anteiligen Effekte biotischer und abiotischer Verwitterung lassen sich in exakter Weise nur in Laborexperimenten unter definierten und aseptischen Bedingungen trennen und quantifizieren. Die biotische Komponente sollte dabei möglichst einfach gehalten werden, um deren Einfluss tatsächlich quantifizieren zu können und der Komplexität geschuldete, sich gegenseitig ausgleichende Effekte zu vermeiden. Um die Komplexität natürlicher Biofilme sinnvoll auf ein Modellsystem zu reduzieren, bedarf es eines Verständnisses ihrer Zusammensetzung unter natürlichen Umweltbedingungen. Dabei sind vor allem bzgl. der Primärbesiedlung relevante Taxa von Interesse.

## 1.2 Biofilme auf Gesteinen

### 1.2.1 Biofilme generell

Biofilme sind Gemeinschaften von Mikroorganismen, die oft in eine Matrix aus extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind und an Oberflächen anhaften [105]. Man geht heute davon aus, dass die Anhaftung an Oberflächen innerhalb von schützenden Biofilmen der vorherrschende Stil mikrobiellen Lebens ist [106, 107]. Natürliche Biofilme sind demnach auch ubiquitär zu finden und bestehen meist aus vielen verschiedenen Organismen.

Die Formation von Biofilmen beginnt normalerweise mit einigen planktonischen oder über den Wind übertragenen Zellen, die sich an eine Oberfläche anhaften und zuerst Mikrokolonien bilden. In einem späteren Stadium entsteht durch die EPS-Ausscheidung ein Biofilm, der komplexe dreidimensionale Strukturen annimmt [107]. Einzelne Zellen können zufällig, z.B. durch Wind und Wasser, oder aktiv - induziert z.B. durch ungünstige Umweltbedingungen - den Standort wechseln und ein neues Habitat aufsuchen. Der Transport kann dabei in Form planktonischer Zellen und Sporen oder anderer mobiler und überdauernder Stadien erfolgen.

Die EPS-Matrix wird manchmal als „das Haus der Biofilm-Zellen“ bezeichnet [108] und besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden, die meist in hydrierter Form vorliegen [109-111]. Sie gibt dem Biofilm mechanische Stabilität und unterstützt seine Adhäsion an die Oberfläche sowie den Zusammenhalt der Zellen innerhalb des Biofilms. Zusätzlich dient die EPS-Matrix als Schutz vor äußeren Umweltbedingungen, als Medium der Kommunikation zwischen Zellen durch den Austausch von Signalmolekülen und als Reservoir für Nährstoffe. Sekretierte Enzyme können extrazellulär wirken und den Aktionsradius einer Zelle bzgl. verwertbarer Nährstoffe erweitern. Eine weitere wichtige Eigenschaft von EPS-Matrices ist die Speicherkapazität von Wasser, was von Mikroorganismen zur Erhöhung der Toleranz gegenüber Austrocknung, Frost- und Salzstress unter extremen Bedingungen verwendet wird [112-114]. So kann die EPS-Matrix bis zu 60% des Trockengewichts der Kolonien ausmachen und z.B. die Fusionierung von Vesikeln der Zellmembranen unter sehr trockenen Bedingungen inhibieren [115].

Gesteinsbiofilme stellen einen besonderen Typ von Biofilmen dar, da sie in vielerlei Hinsicht unter starkem Stress leben müssen, nicht zuletzt bedingt durch ungünstige Nährstoffbedingungen auf Gesteinen.

### **1.2.2 Biofilme und ihre Sukzession auf Gesteinsformationen**

Mikrobielles Leben auf Gesteinsoberflächen hat sich schon sehr früh im Lauf der Evolution entwickelt und ist zunächst aufgrund der extremen Bedingungen an der Grenzfläche zwischen Atmo- und Lithosphäre nur auf bestimmte angepasste Mikroorganismen beschränkt [13]. Dabei können sich mutualistische Gesellschaften oder sogar Symbiosen zwischen verschiedenen Taxa innerhalb der Gesteinsbiofilme bilden. Phototrophe Algen und Cyanobakterien können Sonnenlicht als Energie- und CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle benutzen und brauchen daher lediglich Luft und Wasser zum Aufbau des Großteils der Biomasse. Heterotrophe Pilze und Bakterien können z.T. relevante Elemente aus den Gesteinen verfügbar machen. In den ersten Stadien bilden sich subaerische Biofilme (SABs), die z.T. mit dem bloßen Auge nicht erkennbar sind. SABs werden als mikrobielle Gemeinschaften definiert, die sich auf festen, der Atmosphäre ausgesetzten Mineraloberflächen bilden [13]. Später können bei günstigen Bedingungen auf der Basis dieser Primärsiedler auch Flechten und Moose hinzukommen, bevor Bodenbildung als Grundlage komplexeren Lebens einsetzt.

Gesteinsoberflächen stellen eine sehr alte ökologische Nische dar, die ursprünglich nur von Mikroorganismen bewachsen wurde. Die Sukzession durch makroskopische Vegetation findet auch heute nur unter relativ milden Konditionen statt. Bei extremeren Umweltbedingungen, wie sie in Wüsten oder auch an vertikalen Gebäudewänden vorkommen, dominieren Mikroorganismen und bilden den Großteil der vorhandenen Biomasse [13].

#### **Umweltbedingungen in Gesteinshabitaten**

Auf Gesteinsoberflächen können extreme Bedingungen bzgl. der Luftfeuchte, der Temperatur, der Sonneneinstrahlung und der Nährstoffbedingungen auftreten. Das Hauptproblem von Gesteinsoberflächen als Habitat sind allerdings die starken diurnalen Fluktuationen, die in anderen Habitaten mit extremeren Bedingungen in der Form nicht vorkommen [13]. Diurnale Temperaturunterschiede können - wie z.B. für Gesteine auf Teneriffa beschrieben - bis zu 50°C zwischen Tag und Nacht betragen, wobei sich die Temperatur in den entscheidenden Phasen mit über 3°C pro Minute ändern kann [116]. Wolkenbedeckung, sich schnell ändernde Windgeschwindigkeiten und ein tageszeitlich unterschiedlicher Einfall der Sonnenstrahlung sorgen auch während eines Tages für starke Schwankungen. Durch die hohe Wärmespeicherkapazität der Gesteine äußert sich starke Sonneneinstrahlung hier in höheren Oberflächentemperaturen als in anderen Habitaten oder der Luft.

Die Verfügbarkeit von Wasser kann für das Leben auf Gesteinsoberflächen auch zum limitierenden Faktor werden. Teilweise gibt es in ariden Gebieten sehr lange Trockenphasen, die fast zur vollständigen Austrocknung darauf wachsender Mikroorganismen führen können; manchmal folgen den Trockenphasen starke Gewitter, die mikrobiellen Bewuchs von den Gesteinsoberflächen spülen können. Infrarot- und UV-Strahlungswerte variieren ebenfalls zwischen sehr niedrigen in der Nacht und sehr hohen am Tag. UV-Strahlung führt bei entsprechend hoher Dosis zu DNA-Schäden und kann zudem reaktive Sauerstoff-Spezies produzieren, welche ihrerseits zelluläre Makromoleküle schädigen können [117]. Leben an der nackten Gesteinsoberfläche ist diesen Dosen an UV-Strahlung ausgesetzt und muss logischerweise Schutzmechanismen entwickeln.

Organische Nährstoffe sind auf frisch exponierten Gesteinsoberflächen *per se* nicht vorhanden und werden nur über Partikel in der Luft, durch Regen oder die Mikroorganismen selbst dort deponiert. Um unter diesen Umweltbedingungen zu überleben, bilden sich in den meisten Fällen mutualistische Gemeinschaften aus phototrophen und heterotrophen Organismen, manchmal findet man allerdings auch Kolonien einzelner Organismen. Relevante Taxa auf Gesteinsoberflächen werden im Folgenden vorgestellt.

### **Relevante Taxa und ihre Sukzession**

In subaerischen Biofilmen können Algen, Cyanobakterien, chemolitho- und chemoorganotrophe Bakterien sowie Pilze gefunden werden. Alle Organismen sind von einer EPS-Matrix umgeben, in der sich außerdem organische und anorganische Substanzen befinden. Ein Schema eines typischen subaerischen Biofilms ist in Abb.1 gezeigt (nach [13]).

Die Biofilme passen sich beim Bewuchs der Topographie des Gesteins an, die durch dessen Poren, Spalten, Mineralkörner und Zementierungsmatrix vorgegeben wird. Die Art des Bewuchses innerhalb des Biofilms ist für verschiedene Organismen unterschiedlich. Pilze dringen mit ihren Hyphen in das Gesteinsmaterial ein, während Algen, Bakterien und Hefen mikrokoloniale Aggregate an der Oberfläche - meist in dortigen Einsenkungen - bilden [13]. Die SABs sind dabei im Vergleich zu klassischen, kontinuierlich wasserbedeckten Biofilmen uneinheitlicher aufgebaut; sie bilden Netzwerke zwischen einzelnen Zellaggregaten, indem über Pilzhyphen und EPS-Matrix-Material Risse, Spalten und der Raum zwischen einzelnen Mineralkörnern oder zwischen mehreren Einsenkungen an der Oberfläche überwunden wird.

Durch die ständigen Wechsel der Luftfeuchte und längerer Trockenheit ist eine Speicherung von Wasser für SABs besonders wichtig und wird über die EPS-Matrix realisiert [112, 113, 118]. Dies führt bei Trocknungs-Befeuchtungs-Zyklen zu alternierender Expansion und

Kontraktion der EPS-Matrix, was Einfluss auf das Gestein aber auch auf den Biofilm selbst ausüben kann. Wasser kann so über längere Perioden gespeichert werden und Zellen innerhalb des Biofilms werden in trockenen Phasen in einem überlebensfähigen Zustand gehalten. Zudem wird der Zugang zu in der Atmosphäre vorhandenem Wasser in Form von Wasserdampf erleichtert [13].

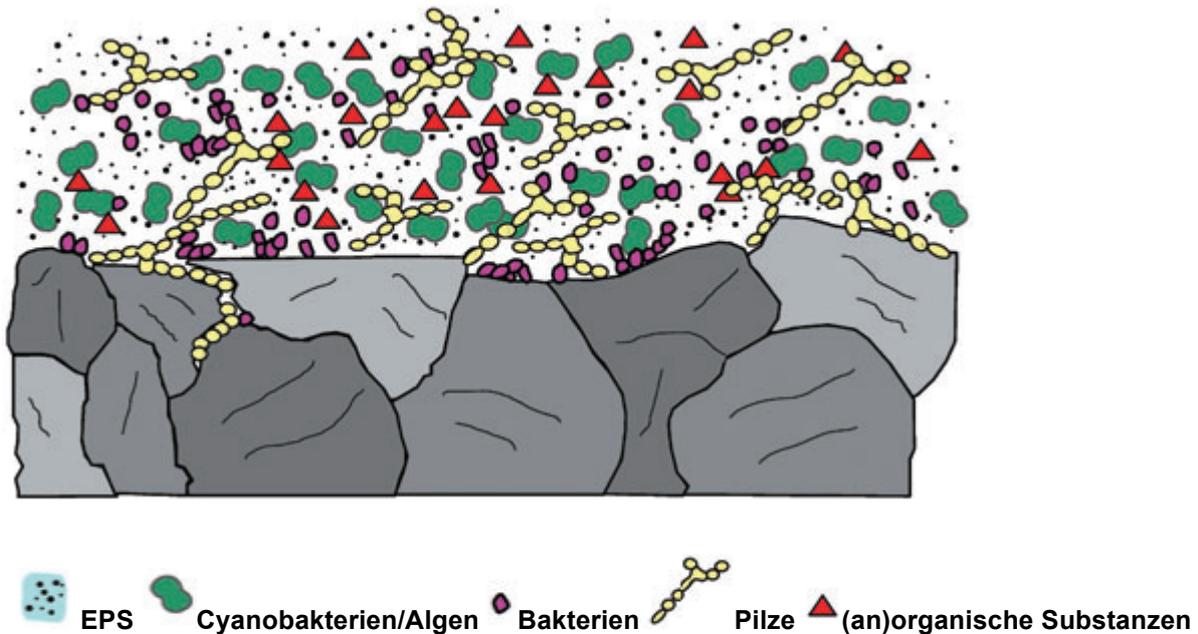


Abb.1: Schema eines typischen subaerischen Biofilms, nach [13]. Cyanobakterien und Algen als Vertreter der phototrophen Organismen sowie Bakterien und Pilze als Vertreter der heterotrophen Organismen sind in eine EPS-Matrix mit organischen und anorganischen Substanzen eingebettet. Der Bewuchs passt sich der Topographie des Gesteins an und formt diese gleichzeitig wie im Fall hineinwachsender Pilzhyphen, die vorhandene Spalten verstärken können.

Für Cyanobakterien wurde gezeigt, dass unter trockenen Umweltbedingungen sekretierte Polysaccharide, Wasserstressproteine und UV-Strahlung absorbierende Pigmente innerhalb der EPS-Matrix zusammenwirken und unter anderem eine Fusion von Membranpartikeln der Zellen verhindern und letztere stabilisieren [118]. Sekretierte extrazelluläre Polysaccharide eines Organismus können auch auf andere Organismen positive Effekte bzgl. der Trocknungstoleranz haben [112]. Diese Beispiele zeigen, dass die in der EPS-Matrix vorkommenden Substanzen nicht einfach nur ausgeschiedene Stoffwechselprodukte sind, die zufällig verteilt vorliegen. Sie werden vielmehr oft aktiv sekretiert und erfüllen spezifische Aufgaben. SABs sind oft sehr heterogen aufgebaut und unterschiedliche EPS können an unterschiedlichen Positionen zur Bildung von Mikrodomänen führen. So entsteht eine Konzentrierung spezifischer Polymere mit bestimmten physikalisch-chemischen Eigenschaften, die an bestimmten Stellen spezifische Reaktionen durchführen [119].

Verschiedene Mechanismen werden von den Mikroorganismen in SABs verwendet, um den extremen Strahlungen zu trotzen. Eine sehr naheliegende Methode, der Strahlung zu entgehen, liegt darin, in das Gestein einzudringen und endolithisch zu leben. Dies wird von zahlreichen gesteinsbesiedelnden Mikroorganismen realisiert [16, 74, 88, 120-122]. An der Oberfläche lebende Organismen besitzen oft thermodynamisch vorteilhafte Oberflächen-Volumen-Verhältnisse und damit runde Zell- bzw. kompakte Kolonieförmigkeiten [123-125].

Weiterhin bilden Gesteinsbesiedler zahlreiche strahlungsabschirmende Pigmente [126]. Scytonemin wird von Cyanobakterien gebildet und ist für die Braunfärbung von cyanobakteriellen Biofilmen oder Mikrobenmatten zuständig; es fungiert als passiver UV-A-Strahlungsschirm [127]. Mykosporene und Mykosporene-ähnliche Aminosäuren kommen in vielen pro- und eukaryotischen Mikroorganismen vor und schützen vor UV-B-Strahlung [128]. Carotinoide werden von Algen, Cyanobakterien und Pilzen gebildet und wirken als Antioxidanten vor allem den reaktiven Sauerstoffspezies entgegen, deren Bildung durch Strahlung induziert wird. Für *Nostoc commune* wurde gezeigt, dass die Konzentration von Carotinoiden unter dem Einfluss von UV-B-Strahlung um bis zu 50% erhöht wird [129]. Melanin wird in vielen verschiedenen Organismen gebildet und schützt vor zahlreichen Stresstypen [117, 126, 130]. Melanin dient als Schutzschild gegenüber Strahlungsenergie, kann gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies und generell Radikalen entgegenwirken, bindet toxische Chemikalien und verhindert damit ein Eindringen in die Zellen, schützt vor enzymatischer Zell-Lyse und kann Sonnenenergie in elektrische Energie oder Hitze umwandeln [117]. Die Effektivität der entsprechenden Pigmente hängt natürlich von der Konzentration in den Zellen und Zellwänden bzw. der EPS-Matrix ab.

Es ist ein generelles Phänomen in der Mikrobiologie, dass Primärbesiedler die nachfolgende Besiedlung durch Sekundärbesiedler erleichtern bzw. ermöglichen [131]. Eine Präkonditionierung von Gesteinsoberflächen durch auf diese ökologische Nische spezialisierte Mikroorganismen und deren Ausscheidung einer EPS-Matrix kann die Oberfläche vielen anderen Organismen zugänglich machen und nachfolgend zu einem schnellen weiteren Bewuchs führen [132]. Innerhalb sich so entwickelnder Biofilme entstehen Kontakte zwischen den verschiedenen Mikroorganismen. Je extremer die Bedingungen sind, desto weniger besteht die Tendenz zu einer konkurrierenden Lebensweise. Mikroorganismen versuchen dann vielmehr, ihre Energie komplett in den Primärmetabolismus und in vor physikalischen Stressfaktoren schützende Sekundärmetabolite oder in symbiotische Lebensweisen zu investieren [13]. Es kommen viele solcher Symbiosen auf Gesteinen vor; oft bestehen sie aus Cyanobakterien und heterotrophen Organismen [133]. Phototrophe können im Gegensatz zu heterotrophen Organismen nur aus CO<sub>2</sub>, Wasser und Sonnenenergie den Hauptteil ihrer Biomasse

aufbauen und stellen somit theoretisch die idealen Primärbesiedler dar. Tatsächlich hängt die Frage nach der Primärbesiedlung von Gesteinen mehr von der Poikilotoleranz der Mikroorganismen ab als von ihren Energie- und Nahrungsquellen [13]. In diesem Zusammenhang erscheint auch das Konzept der Poikilotrophie als wichtig [134]. Organismen, die vielen und wechselnden Stressbedingungen trotzen und wechselnde Nahrungsquellen in geringen Mengen nutzen können, besitzen Vorteile bzgl. der Primärbesiedlung von Gesteinen. So können auch chemoorganotrophe Organismen, die Nahrungs- und Energiequellen aus luftübertragenen Partikeln erhalten, als Primärbesiedler fungieren [124, 135].

Welche Organismen auf Gesteinshabitaten dominieren hängt vom Gesteinssubstrat, von den äußeren Stressfaktoren und von der Deposition organischer Partikel ab. Zwei besonders stressresistente Taxa stellen Cyanobakterien und mikrokoloniale Pilze dar [112-114, 136].

### **Mikrokoloniale Pilze**

Mikrokoloniale Pilze wurden erstmals von Staley et al. (1982) auf Gesteinen in Wüsten beschrieben [124]. Diese Pilze bilden Kolonien mit einer Größe von gewöhnlich <100 µm und kommen ubiquitär in ariden Gesteinshabitaten vor. Sie sind auf der Gesteinsoberfläche metabolisch aktiv und man geht davon aus, dass in Abwesenheit von phototrophen Biofilmpartnern Nährstoffe bzw. Kohlenstoffquellen durch windübertragene Partikel auf die Gesteine gelangen und somit verfügbar werden. Eine Kohlenstoffzufuhr durch windübertragene Partikel erscheint als Nährstoffquelle auf der Grundlage von Daten zur Deposition von Staub und organischer Materie in gemäßigten und mediterranen Klimazonen sowie der theoretisch benötigten organischen Materie für das Koloniewachstum als möglich [53]. Langsames Wachstum und eine oligotrophe Lebensweise begünstigen ein Leben unter solchen extremen Bedingungen [137, 138]. Systematisch wird diese polyphyletische Pilzgruppe innerhalb der Ascomyceten eingeordnet.

Mikrokoloniale Pilze können bei niedriger Luftfeuchte Temperaturen von bis zu 80°C überleben, ein Wachstum ist jedoch meist nur bei Temperaturen von weniger als 50°C möglich [139]. Gesteinsoberflächen weisen bei hoher Sonneneinstrahlung deutlich höhere Temperaturen auf als die Luft [140]. Unter den extremen Bedingungen von Wüsten können demnach die Temperaturen auf den Gesteinsoberflächen 50°C überschreiten; mikrokoloniale Pilze wechseln daher häufig zwischen aktivem und inaktivem Zustand, was in einem sehr langsamen Wachstum resultiert. Verbunden mit der Toleranz gegenüber hohen Temperaturen können mikrokoloniale Pilze auch extreme Austrocknung überstehen; schnelles Austrocknen führt dabei zu höheren Überlebensraten als langsames [141].

Ebenfalls gegenüber Salzstress konnte eine hohe Toleranz seitens mikrokolonialer Pilze gezeigt werden [136].

Diese Toleranz gegenüber Stressfaktoren ist zu einem großen Teil auf Melanin zurückzuführen, das viele Vertreter dieser Gruppe in hoher Konzentration in den Zellwänden enthalten. Die damit verbundene Schwarzfärbung der Zellen hat dazu geführt, dass in der Literatur teilweise von „schwarzen Pilzen“ oder „schwarzen Hefen“ gesprochen wird [6, 7, 142]. Anhand eines typischen Vertreters dieser Gruppe konnte gezeigt werden, dass mikrokoloniale Pilze auch verschiedene Carotinoide enthalten, darunter  $\beta$ -Carotin,  $\zeta$ -Carotin, Phytoin, Torularhodin und Torulen [141].

Die Morphologie dieser Pilze ist uneinheitlich, da das Wachstum zwischen verschiedenen Formen wechseln kann. Es findet meristematisches, filamentöses und auch hefeartiges Wachstum statt [143]. Mikrokoloniale Pilze kommen in Wüsten und auf Monumenten im mediterranen Raum, aber auch in gemäßigten Klimazonen vor [124, 143-145]. Einige Vertreter sind auch in Bädern oder Luftbefeuchtungsanlagen zu finden [146, 147].

Die Gruppe der mikrokolonialen Pilze spielt eine große Rolle bei der ästhetischen Verunreinigung von Denkmälern und Monumenten aus Naturstein, die auf die Pigmentierung der Pilze zurückzuführen ist [6, 7, 51, 148].

## **Cyanobakterien**

Cyanobakterien sind Prokaryoten mit einem photosynthetisch aktiven Apparat in ihren Zellen, der sie zu meist oxygener Photosynthese befähigt [149]. Sie existieren seit mindestens 2,7 Milliarden Jahren [150] und haben entscheidend zur Anreicherung von Sauerstoff in der Erdatmosphäre beigetragen [151]. Auch heute sind Cyanobakterien für 30% des jährlich auf der Erde produzierten Sauerstoffs verantwortlich, wobei der von Chloroplasten in Algen und Landpflanzen produzierte Anteil letztendlich auch auf Cyanobakterien zurückgeht, denn man geht heute davon aus, dass die Chloroplasten in eukaryotischen Zellen durch Endosymbiose von Verwandten heutiger Cyanobakterien entstanden sind [152].

Cyanobakterien stellen eine sehr weitgefaste Gruppe an Organismen mit sehr unterschiedlichen Zellmorphologien und physiologischen Eigenschaften dar. Es gibt einzellige Vertreter und solche, die lange Filamente aus vielen Zellen aufbauen. Fixierung von molekularem Stickstoff aus der Atmosphäre kommt bei Vertretern einzelliger und filamentöser Gruppen vor. Da das dafür zuständige Enzym Nitrogenase sauerstoffsensitiv ist, müssen Stickstofffixierung und oxygene Photosynthese in irgendeiner Form getrennt

werden. Bei einigen Cyanobakterien erfolgt diese Trennung zeitlich [153, 154], andere bilden dafür spezialisierte Zellen, sogenannte Heterozysten, aus [155]. Heterozysten werden nur bei einem Mangel an kombiniertem Stickstoff innerhalb der Zellfäden gebildet; sie sind größer als die anderen Zellen und erscheinen im Gegensatz zu diesen nicht grün, da hier kein photosynthetischer Apparat und kein Chlorophyll aufgebaut werden. Zudem ist die Zellatmung zur Entfernung von molekularem Sauerstoff in diesen Zellen erhöht.

Bei Energie- oder Nahrungslimitierung können sich auch Überdauerungsstadien bilden, welche Akineten genannt werden. Sie akkumulieren unter anderem Cyanophycin, ein Aminosäurepolymer, das als Stickstoffspeicher fungiert, und verdicken die Zellwand. Akineten sind besonders tolerant gegenüber Austrocknung und niedrigen Temperaturen [156]. Filamente können entweder mobil oder immobil sein, kurze Teile der Filamente können sich vom Mutterfilament abkoppeln und als mobile Hormogonien den Standort wechseln [149, 157]. Dies dient der Verbreitung, der Bewegung zu Symbiosepartnern oder der Entfernung von einem Ort mit ungünstigen Umweltbedingungen. Eine weitere Form des Wachstums unter Stressbedingungen ist die Anordnung der Zellen in Zellpaketen; üblicherweise sind das vier Zellen, die von einer Hülle umgeben werden [157].

Cyanobakterien sind gegenüber sehr vielen verschiedenen Stressbedingungen, hervorgerufen unter anderem durch Hitze, Austrocknung, Sonnenstrahlung und hohe Salzkonzentrationen, tolerant [112-114, 118]. Wasserstressproteine, Polysaccharide in EPS-Matrices, die Anordnung der Membranen und nicht zuletzt UV-Strahlung absorbierende Pigmente sind dafür verantwortlich [118, 158-160]. Vorkommende Pigmente sind Scytonemin und Carotinoide, meist  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Echinon [127, 149].

Cyanobakterielle EPS bestehen aus einer relativ hohen Anzahl unterschiedlicher Monosaccharide, meist finden sich 6-10 verschiedene solcher Einfachzucker [161]. Dies übersteigt den Anteil an Monosacchariden, der sich in vielen Polysacchariden pro- und eukaryotischer Herkunft befindet, deutlich. Ein Vorteil dieser Monosaccharid-Diversität besteht darin, dass eine größere Anzahl unterschiedlicher EPS-Strukturen ermöglicht wird [162]. Die am häufigsten in Cyanobakterien-EPS vorkommenden Monosaccharide sind Arabinose, Fucose, Galactose, Galacturonsäure, Glucose, Glucuronsäure, Mannose, Rhamnose und Xylose [161].

Cyanobakterien werden als wichtige Vertreter der Stromatolithen bildenden Organismen angesehen [163-165]. Stromatolithen bilden sich in seichten Gewässern, indem bestehende Mineralkörner in Biofilmstrukturen eingebunden werden und neue Minerale innerhalb der Biofilme präzipitieren; vorhandene Sedimentgesteinskörner werden dabei zementiert [166-168]. Mit der Zeit verdichten sich die Gemische aus Biofilm und Gestein immer mehr und

bilden schließlich steinharte, geschichtete Strukturen aus, die der Etymologie ihrer Bezeichnung gerecht werden („Stromatolith“ wurde 1908 von Kalkowsky eingeführt, griechisch „στρώμα“ (stroma) bedeutet „Decke“ und griechisch „λίθος“ (lithos) bedeutet „Stein“ [169]). Cyanobakterien kommen ubiquitär vor, sie besiedeln nahezu alle extremen Habitate auf der Erde [122, 170]. Dabei spielen sie eine wichtige Rolle bei der Verwitterung von Gestein und bzgl. der Biodeterioration von Monumenten [74, 85, 171].

### 1.3 Ein Modellbiofilm

Aufgrund der Komplexität natürlicher Biofilme, soll für die Untersuchung von Gesteinsbewuchs und biotisch induzierter Gesteinsverwitterung ein einfacher Modellbiofilm verwendet werden. Das vereinfachte Modell besteht aus dem phototrophen Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* und dem heterotrophen mikrokolonialen Pilz *Knufia petricola*, die beide auch natürlicherweise in SABs vorkommen [172-174].

#### 1.3.1 *Nostoc punctiforme*

*N. punctiforme* ist ein filamentöses Cyanobakterium, das molekularen Stickstoff fixieren kann [175]. Die Stickstofffixierung erfolgt über Heterozysten; Akineten und Hormogonien können auch gebildet werden. Bei ausreichender Menge an Nährstoffen teilen sich die vegetativen Zellen und führen zu einem Wachstum der Filamente. Die Bildung von Heterozysten, Akineten und Hormogonien erfolgt nur durch Signale jeweils spezifischer Änderungen der Umweltbedingungen. Heterozysten werden bei einem Mangel an kombiniertem Stickstoff gebildet, Akineten kommen generell in der Stationärphase vor, induziert wahrscheinlich durch Nährstoff- und Lichtmangel. Hormogonienbildung kann positiv oder negativ durch symbiotische Interaktionen beeinflusst werden [176, 177]. Von Pflanzen produzierte chemotaktische Signale können zur Attraktion von Hormogonien führen [178].

*N. punctiforme* kann sowohl phototroph als auch heterotroph leben, je nachdem, wie die Licht- und Nährstoffbedingungen sind. Das photosynthetisch aktive Pigment ist wie bei allen Cyanobakterien Chlorophyll a. Symbiosen werden mit Vertretern verschiedener Taxa ausgebildet, unter anderem mit Moosen, Palmfarnen und *Gunnera*-Arten [175].

*N. punctiforme* ist bereits gut charakterisiert, vollständig sequenziert und annotiert [173].

### **1.3.2 *Knufia petricola***

*K. petricola* (alte Bezeichnung: *Sarcinomyces petricola*) ist ein mikrokolonialer Pilz, der zur Ordnung der *Chaetothyriales* gehört [179]. Er bildet schwarze Kolonien und kommt natürlicherweise auf Gesteinen vor. Die Zellen zeigen meristematisches, hefeartiges und Hyphenwachstum [174]. *K. petricola* ist äußerst tolerant gegenüber zahlreichen Umweltfaktoren wie UV-Strahlung, Austrocknung, Salz- und osmotischem Stress, was auf zahlreiche UV-Strahlung absorbierende Pigmente zurückzuführen ist. Wachstum erfolgt bei Temperaturen bis zu 30°C, aber nicht bei 37°C. Das pH-Optimum liegt bei pH 5. *K. petricola* kann als oligotropher Pilz bezeichnet werden und zeigt in Laborexperimenten auch ohne Zugabe von Stickstoff, Schwefel und Phosphor metabolische Aktivität [179].

Melanin ist in großer Menge in den Zellwänden eingelagert und führt zur Schwarzfärbung dieses Pilzes [141, 180]. Zusätzlich konnten Mykosporine und verschiedene Carotinoide nachgewiesen werden. *K. petricola* kann auch ohne phototrophe Organismen auf Gesteinsoberflächen leben und ist relevant bzgl. der Biodeterioration von Kulturgut, da er zu dessen Patinierung führt. Die induzierte Bildung von Ätzgruben wird in diesem Zusammenhang in der Literatur auch diskutiert [174].

### **1.3.3 Fakultative Symbiose**

Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass *K. petricola* und *N. punctiforme* gemeinsame Biofilme ausbilden können. Mikroskopische Aufnahmen von Mischkulturen zeigen eine räumliche Nähe beider Organismen mit einer komplexen Anordnung zueinander [148]. Über die Mechanismen der mutmaßlich mutualistischen Beziehung von *K. petricola* und *N. punctiforme* ist allerdings bisher nichts bekannt.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit soll anhand des Biofilms aus *K. petricola* und *N. punctiforme* als Modell die Besiedlung von Gesteinen, die sich bzgl. der physikalischen und chemischen Parameter in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, untersucht werden. Dabei soll eruiert werden, wie die unterschiedlichen Gesteine aber auch verschiedene Witterungsbedingungen die Abundanzen und Biofilmstrukturen der beiden Organismen beeinflussen. Gleichzeitig soll anhand des Biofilms modellhaft der biologische Anteil an der Verwitterung von Gesteinen ermittelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gesteinsmaterial

##### 2.1.1.1 Experimente zum Gesteinsbewuchs und zur Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen

Das Ausgangsmaterial für die Experimente zum Gesteinsbewuchs sowie zur Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen waren folgende 5 an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung vorliegende Materialien:

1) Baumberger Sandstein wird in den Baumbergen im Münsterland (Westfalen) abgebaut und gehört zu den sandsteinartigen Karbonatgesteinen. Es handelt sich um einen gelblich-grauen, sandigen, Fossil führenden und feinporigen Kalkstein. Er wird als Baustoff verwendet wie z.B. im Kölner Dom und im Dom von Münster und ist beschrieben in [181] als Gestein Nr. 145.

2) Ettringer Tuff wird in Ettringen (Eifel bei Mayen, Rheinland-Pfalz) abgebaut. Es handelt sich um einen graugelblichbraunen, bunt-fleckigen vulkanischen Tuff mit gleichmäßig verteilten Einschlüssen in einer mikrokristallinen bis hyalinen Grundmasse. Er wird als Baustoff verwendet wie z.B. beim Arbeitsamt in Mainz und beim Justizgebäude in Koblenz und ist beschrieben in [181] als Gestein Nr. 44.

3) Der verwendete Marmor wurde ursprünglich in Oldenburg gekauft und im Vorfeld der vorliegenden Arbeit charakterisiert. Er wurde bereits in Experimenten mit *K. petricola* verwendet [6].

4) Postaer Sandstein, Varietät Bh wird in Wehlen (Sachsen) abgebaut. Es handelt sich um einen mittel- bis grobkörnigen Sandstein mit hellgelber bis bräunlich gelber Farbe. Die Hauptphasen bestehen aus Quarz, Nebenphasen aus Kaolinit und Bindemittelphasen aus Illit und Kaolinit. Er wird als Baustoff verwendet wie z.B. in der Dresdner Frauenkirche und ist beschrieben in [182].

5) Savonnières Kalkstein wird in Meuse und Haute-Marne bei St. Dizier (Frankreich) abgebaut. Es handelt sich um einen hellen, oolithischen Kalkstein mit 96-99%

Calciumcarbonatgehalt. Er wird als Baustoff verwendet wie z.B. im Ulmer Münster und im Aachener Dom und ist beschrieben unter [183].

Alle fünf in diesen Versuchen verwendeten Materialien wurden im Vorfeld bzgl. der Dichte, Porosität, Wasseraufnahme, Luftpermeabilität und der spezifischen Oberfläche untersucht. Diese Daten sowie die jeweiligen pH-Werte sind in Tab.1, die chemische Zusammensetzung in Tab.2 gezeigt.

Tab.1: Verwendete Materialtypen mit einigen der physikalischen Kenngrößen sowie den pH-Werten in Millipore-Wasser und 1 N KCl.

<b>Material</b>	<b>Baumberger Sandstein</b>	<b>Ettringer Tuff</b>	<b>Marmor</b>	<b>Postaer Sandstein</b>	<b>Savonnières Kalkstein</b>
<b>Eigenschaft</b>					
Dichte, roh [g/cm <sup>3</sup> ]	2,18	1,48	2,84	2,11	1,78
Dichte, rein [g/cm <sup>3</sup> ]	2,7	2,57	2,87	2,65	2,72
Porosität [Vol. %]	19,08	42,55	1,05	20,3	34,53
H <sub>2</sub> O-Aufnahme unter atm [Gew. %]	6,42	19,88	0,03	5,6	3,2
H <sub>2</sub> O-Aufnahme unter Vakuum [Gew. %]	8,76	28,85	0,05	8,8	7,9
Sättigungsgrad	0,73	0,69	0,67	0,64	0,4
Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	9,23	44,42		0,62	1,16
pH in 1N KCl	9,3	9,5	9,7	9,3	9,9
pH in H <sub>2</sub> O	9,4	8,9	9,5	7,9	10,1
Oberflächen pH	7,7	7,8	7,4	7,8	7,9

Tab.2: Verwendete Materialtypen mit deren chemischen Zusammensetzungen.

<b>Material Element</b>	<b>Baumberger Sandstein</b>	<b>Ettringer Tuff</b>	<b>Marmor</b>	<b>Postaer Sandstein</b>	<b>Savonnières Kalkstein</b>
Ba [%]	-	1	-	-	-
CaO [%]	70,4	26,5	99,4	1	98,6
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [%]	3,76	35,9	0,1	0,49	0,6
K <sub>2</sub> O [%]	1,37	26,2	-	-	-
MnO [%]	-	1,5	-	-	-
Nb [%]	-	0,5	-	-	-
Rb [%]	-	0,4	-	-	-
S [%]	-	-	-	-	0,6
SiO <sub>2</sub> [%]	23,3	2	-	98	-
Sr [%]	0,71	2,3	0,08	-	0,12
TiO <sub>2</sub> [%]	0,39	3,2	-	-	-
Zr [%]	-	0,8	-	-	-
Σ [%]	99,93	100,3	99,6	99,49	99,92

### 2.1.1.2 Experimente zur Granitverwitterung

Das Ausgangsmaterial für die Experimente zur Granitverwitterung waren Bruchstücke eines Granits, welcher bei Bauhaus (Bauhaus AG, Zug, Schweiz) unter der Artikelnummer OS6261 erworben wurde. Der Granit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit chemisch und mineralogisch charakterisiert. Für weiterführende Experimente wurden beim Rheinischen

Mineralienkontor (Dr. F. Krantz Rheinisches Mineralien-Kontor GmbH, Bonn) Albit mit der Bestellnummer X01201 und Mikroklin mit der Bestellnummer X01271 bestellt.

### **2.1.1.3 Experimente zur Verwitterung einzelner Minerale**

Das Ausgangsmaterial für die Experimente zur Verwitterung einzelner Minerale waren ein durchsichtiger Doppelspat Calcit (Klaus Lenz GmbH, Berlin), Olivin Trommelsteine (Mineraliengroßhandel Hausen GmbH, Telfs, Österreich) und Forsterit, welcher aus Magnesiumoxid (VWR International, Dresden) und Siliziumdioxid (Merck, Darmstadt) in der vorliegenden Arbeit in mikrokristalliner Form hergestellt wurde.

### **2.1.2 Biologisches Material**

1) *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde aus dem Labor von Jack Meeks (University of California, USA) erhalten. Die Kulturen wurden bei -80°C mit 5% DMSO versetzt für die Langzeitaufbewahrung gelagert. Aus solchen Stocklösungen wurden je 200 µl Kultur mit 20 ml BG11 Medium (Rezept in 2.1.3) mit einem pH-Wert von 7,5 in 100 ml Erlenmeyer Kolben versetzt und in einem klimatisierten Schüttler (Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) bei 160 rpm, 25°C und 90 µmol Photonen/m<sup>2</sup> \* s an Lichtstärke photosynthetisch aktiven Lichts (liegt bei 400-700 nm Wellenlänge) inkubiert. Die Kulturen wurden wöchentlich 1:100 verdünnt in frisches BG11-Medium umgesetzt; nach zehn Umsetzungen wurde erneut aus der Stocklösung angeimpft, um eine Veränderung der Stämme zu vermeiden. Für die Experimente wurden Kulturen nach 7-14 d Wachstum unter diesen Bedingungen verwendet.

2) *Knufia petricola* CBS 726.95 wurde ursprünglich vom Parthenon-Tempel der Akropolis (Athen, Griechenland) isoliert. Die Kulturen wurden in Schrägagar-Röhrchen bei 4°C für die Langzeitaufbewahrung gelagert. Etwas Koloniematerial wurde in 20 ml MEB Medium (Rezept in 2.1.3) in 100 ml Erlenmeyer Kolben versetzt und in einem Schüttler (Kühner AG) bei 100 rpm und 25°C inkubiert. Die Kulturen wurden wöchentlich 1:100 verdünnt in frisches MEB-Medium umgesetzt; nach zehn Umsetzungen wurde erneut aus einem Schrägagar-Röhrchen angeimpft, um eine Veränderung der Stämme zu vermeiden. Für die Experimente wurden Kulturen nach 7-14 d Wachstum unter diesen Bedingungen verwendet.

## 2.1.3 Verwendete Chemikalien

### 2.1.3.1 Chemikalienliste

Chemikalie	Formel	Liefernde Firma
Agar Agar, Kobe I		Roth (Karlsruhe)
Agarose für die Elektrophorese		Serva (Heidelberg)
Ammonium Eisen(III)-citrat	$\text{NH}_4\text{Fe(III)-citrat}$	Merck (Darmstadt)
Borsäure	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Scharlau (Barcelona, Spanien)
Calciumchlorid-Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Calcofluor White		Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)		Sigma-Aldrich
Citrat-Monohydrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Cobaltchlorid-Hexahydrat	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	AppliChem (Darmstadt)
CTAB	$(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$	Sigma-Aldrich
DMSO		AppliChem
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Roth
Ethanol p.a.	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck
GelRed™		Genaxxon (Ulm)
Glucose-Monohydrat	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
Glutaraldehyd	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	Merck
Kaliumchlorid	KCl	AppliChem

Kaliumdihydrogenphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	AppliChem
<b>Chemikalie</b>	<b>Formel</b>	<b>Liefernde Firma</b>
di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Applichem
Magnesiumoxid	$\text{MgO}$	VWR International (Dresden)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Malzextrakt		Merck
Manganchlorid	$\text{MnCl}_2$	Sigma-Aldrich
Methanol p.a.	$\text{CH}_3\text{OH}$	Merck
Natriumcarbonat	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck
Natriumchlorid	$\text{NaCl}$	Roth
Natrium-EDTA	Na-EDTA	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Riedel-deHaen (Seelze)
Natriummolybdat-Dihydrat	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Natriumnitrat	$\text{NaNO}_3$	Merck
Natriumsulfat	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Sigma-Aldrich
Pepton aus Casein		Merck
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)		AppliChem
Polyethylenglykol 6000		AppliChem
Salpetersäure, 65%	$\text{HNO}_3$	AppliChem

Salzsäure, 37%	HCl	Merck
<b>Chemikalie</b>	<b>Formel</b>	<b>Liefernde Firma</b>
Siliziumdioxid	SiO <sub>2</sub>	Merck
TAE Puffer, 50X		Fermentas
Thiaminhydrochlorid	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS * HCl	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure, 99%	C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	VWR International
Zinksulfat-Heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	AppliChem
Zirconia Silica beads		Cole Parmer (Vernon Hills, Illinois, USA)

### 2.1.3.2 Rezepte für verwendete Lösungen/Medien

Die Firmen, von denen die im Folgenden aufgeführten Chemikalien in den entsprechenden Rezepten bezogen wurden, sind der vorher aufgeführten Chemikalienliste zu entnehmen.

**BG11 Medium** (Blue-Green Medium) für Algen und Cyanobakterien, beschrieben in [184]:

Zunächst wurden 4 Stammlösungen zur Langzeitaufbewahrung hergestellt, um die alltägliche Herstellung von frischem BG11 Medium zu beschleunigen.

#### Stammlösung 1:

- Na- EDTA (Titriplex) 0,1 g/l
- NH<sub>4</sub>Fe(III)-citrat 0,6 g/l
- Citrat \* 1 H<sub>2</sub>O 0,6 g/l
- CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O 3,6 g/l

#### Stammlösung 2:

- MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O 7,5 g/l

### Stammlösung 3:

-  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  4,0 g/l

### Stammlösung 4:

-  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,86 g/l

-  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  1,81 g/l

-  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,222 g/l

-  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,079 g/l

-  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,005 g/l

-  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,391 g/l

Die Stammlösungen 1-4 wurden den obigen Rezepten entsprechend in Millipore-Wasser gelöst und bis zur weiteren Benutzung bei Raumtemperatur gelagert.

Das Rezept zur Herstellung von 1 l frischen BG11 Mediums ist folgendes:

-  $\text{NaNO}_3$  1,50 g

-  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,02 g

- Stammlösung 1 10 ml

- Stammlösung 2 10 ml

- Stammlösung 3 10 ml

- Stammlösung 4 1 ml

- Millipore-Wasser ad 1 l

Für die Anzucht von *N. punctiforme*-Kulturen wurde der pH-Wert auf 7,5, für Versuche mit Mischkulturen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* auf 6 eingestellt.

### **BG11<sub>0</sub> Medium**

Für einige Experimente wurde ein BG11<sub>0</sub> Medium ohne Stickstoffquelle verwendet, das analog zum BG11 Medium, allerdings ohne die Zugabe von NaNO<sub>3</sub>, hergestellt wurde.

Für die Herstellung von BG11/BG11<sub>0</sub> Festmedien wurden zusätzlich 15 g/l Agar hinzugegeben.

**MEB Medium** (Malzextrakt Medium, engl. „malt extract broth“) für Pilze:

- Malzextrakt                    20 g
- Pepton aus Casein        1 g
- Glucose \* 1 H<sub>2</sub>O        20 g
- Millipore-Wasser        *ad 1 l*

Für die Herstellung von Festmedium wurden zusätzlich 15 g/l Agar hinzugegeben.

### **Verwitterungsmedium 1: Medium für Experimente zur Granitverwitterung**

Das Medium für die Säulenexperimente zur Granitverwitterung bestand aus Millipore-Wasser mit Zusatz von 0,1% Glucose-Monohydrat und 10 µM Thiaminhydrochlorid. Der pH-Wert lag vor dem Autoklavieren bei 5,6.

### **Verwitterungsmedium 2: Medium für Experimente zur Verwitterung einzelner Minerale**

- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                    43 mg/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O        47 mg/l
- Glucose \* 1 H<sub>2</sub>O        1000 mg/l
- Thiaminhydrochlorid        3,4 mg/l
- Millipore-Wasser                *ad 1 l*

Der pH-Wert lag vor dem Autoklavieren bei 7,8.

### **Waschlösungen**

- 1) Physiologische Kochsalzlösung: 0.9% NaCl in Millipore-Wasser
- 2) BG11 Medium, 1:10 verdünnt
- 3) Medium für Experimente zur Granitverwitterung

## **Lösungen für die Extraktion von DNA von *K. petricola* und *N. punctiforme***

### 1) CTAB-Puffer, modifiziert

- CTAB 10%
- NaCl 0,7 M
- $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ -Puffer, pH 8 240 mM
- Millipore-Wasser *ad* 1 l

### 2) PEG-Lösung (Polyethylenglykol)

- Polyethylenglykol (PEG) 30%
- NaCl 1,6 M
- Millipore-Wasser *ad* 1 l

Alle weiteren für die DNA-Extraktion verwendeten Chemikalien lagen bereits fertig vor und sind in der Chemikalienliste zu finden (2.1.3.1).

## **Lösungen für die EPS-Extraktion**

### 1) EDTA-Lösung: 2% EDTA in Millipore-Wasser

## **Alkohol-Lösungen**

### 1) 90% Methanol

100%iger Methanol p.a. (Merck) wurde mit Millipore-Wasser auf 90% verdünnt.

### 2) 30%, 50%, 70%, 80%, 90% Ethanol

100%iger Ethanol p.a. (Merck) wurde mit Millipore-Wasser auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

## **Lösungen zur Fixierung von biologischem Material**

### 1) Glutaraldehydlösung (4%)

Aus einer 25%igen sterilen Glutaraldehyd-Stammlösung (Merck) wurde mit sterilem  $\text{Na}_2\text{HP}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (0,1 M, pH 7) auf eine Konzentration von 4% verdünnt.

2) 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HP}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer

61,5 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung und 38,5 ml 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung wurden mit Millipore-Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert lag anschließend bei pH 7.

## **2.1.4 Verwendete Geräte und Materialien**

### **2.1.4.1 Allgemein verwendete Geräte**

Autoklav VX 75 (Systec, Wetzlar)

Brutschränke (Mettler, Schwerdtfagen)

Feinwaage AW-224 (Sartorius, Göttingen)

Flockeneisbereiter (Hoshizaki, Nagoya, Japan)

Gefrierschränke -20°C (Liebherr, Bulle, Schweiz)

Gefrierschränke -80°C Forma 900 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Geldokumentationssystem ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Homogenisator/Ribolyser (Hybaid GmbH, Heidelberg)

Klimakammern Persival (Geneva Scientific, Fontana, USA)

Kühlschränke FKvsi4112 (Liebherr)

Mikroskop Primostar (Zeiss, Jena)

Mikroskop VHX1000 (Keyence, Osaka, Japan)

Nanodrop 2000c (Qiagen, Venlo, Niederlande)

PCR Box (Plas-Labs, Lansing, MI, USA)

pH-Meter PB-11 (Sartorius)

pH-Meter 763 Multi-Calimatic (Knick GmbH, Berlin)

Real Time PCR System CFX96 (Bio-Rad)

Reinstwasseranlage (Milli-Q, Merck)

Schüttler (Kühner AG, Birsfelden, Schweiz)

Schwingmühle Retsch MM400 (Retsch GmbH, Haan)

Stereomikroskop 2000C (Zeiss)

Sterilwerkbänke Safeflow 1,8 (BioAir, Siziano, Italien)

Thermal Cycler C1000™ (Bio-Rad)

Thermal Cycler S1000™ (Bio-Rad)

Trockenschrank (Mettler)

Waagen AW-4202 (Sartorius)

Zentrifugen 5430R/5418/5415R (Eppendorf, Hamburg)

#### **2.1.4.2 Allgemein verwendete Labormaterialien**

Campingaz Brenner (Coleman Company, Wichita, Kansas, USA)

Falcon Röhrchen (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich)

Glasgefäße (Duran Group GmbH, Wertheim)

Glasrohre (Duran Group GmbH)

Gel-Apparaturen für Agarosegele (Helixx Technologies, Toronto, Kanada)

Gummistopfen, normal und durchbohrt (Labmarket GmbH, Mannheim)

Hämozytometer (Brand GmbH, Wertheim)

Mahlbecher, aus Stahl oder Kunststoff (Eigenproduktion der BAM)

Mahlkugeln, aus Glas oder Edelstahl, 5 mm Durchmesser (VWR International)

Petrischalen (VWR International)

Reaktionsgefäße, 1 oder 2 ml (Eppendorf)

Rotilabo®-Aluminiumfolie (Roth)

Roti®-Nitrozellulosemembranen (Roth)

Schraubkappen, normal und durchbohrt (Duran Group GmbH)

Verbindungsstücke (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)

Wilo-Klemmen (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH)

#### **2.1.4.3 Verwendete Geräte und Materialien für Versuche zum Gesteinsbewuchs unter variierenden Bedingungen**

Durchflussskammer-Zubehör, Vakuumpumpe/Funkuhr-gesteuerte Ventile usw. (Durakult GmbH, Berlin)

Sterilfilter (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel)

TCS SP5X Mikroskop (Leica, Heidelberg)

#### **2.1.4.4 Verwendete Geräte und Materialien für Versuche zur Gesteinsverwitterung**

Glassäulen behrotest® (behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf)

Metrigard® Glasfaserfilter (VWR International)

Mikrosonde JEOL JXA 8200 Superprobe (Jeol, Tokyo, Japan)

Peristaltikpumpe ICP12 (IDEX Health & Science, Oak Harbor, WA, USA)

Pharmed-2Stopper-Schläuche (VWR International)

Polypropylenbehälter Nalgene™ (Thermo Scientific)

PTFE-Einsätze (behr Labor-Technik GmbH)

Silikonschläuche (VWR International)

Zellkulturflaschen (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generelle Methoden

Um aseptisches Arbeiten zu gewährleisten, wurden für die Experimente verwendete Lösungen und Materialien sterilisiert. Dies erfolgte, wenn nicht anders angegeben, durch Autoklavieren bei 121°C für 15 Minuten.

#### **Vorbereitung der Kulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme***

Kulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* wurden jede Woche entsprechend der Beschreibungen in 2.1.2 umgesetzt. 7-14 d alte Kulturen, die sich in Passagierungswoche 2-10 befanden, wurden für sämtliche Experimente herangezogen. Um homogene Zellsuspensionen zu erhalten, wurden Kulturen von *K. petricola* in Stahlmahlbechern mit 8 Stahlkugeln (5 mm Durchmesser) für 10 Minuten bei 30 Hz und Kulturen von *N. punctiforme* in Kunststoffmahlbechern mit 4 Glaskugeln (5 mm Durchmesser) für 5 Minuten bei 25 Hz in einer Schwingmühle (Retsch) homogenisiert. Danach wurden die homogenen Zellsuspensionen in 15 oder 50 ml Falcon Röhrchen (Greiner) zweifach gewaschen, bevor eine Aufnahme in das für die Inokulation endgültige Medium erfolgte. Die Waschschriffe wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 0,9%iger Natriumchloridlösung für *K. petricola* und mit 1:10 verdünnter BG11-Nährlösung (pH 7,5) für *N. punctiforme* durchgeführt; dazu wurde zunächst jeweils für 15 Minuten bei 7500 rpm in einer Zentrifuge vom Modell 5430 R (Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das gleiche Volumen an Waschlösung hinzugegeben, bevor durch Schütteln oder Vortexen eine erneute Homogenisierung erfolgte. Nach Aufnahme in das für die Inokulation finale Medium konnte die Zellkonzentration bestimmt und aus der für das Experiment benötigten Startzellzahl das zu verwendende Volumen an Inokulum berechnet werden.

#### **Abschätzung der Zellzahlen von *K. petricola*-Kulturen für die Berechnung von Inokula**

Um für die Inokulation mit *K. petricola*-Kulturen deren Zellkonzentration abschätzen zu können, wurden verschiedene Verdünnungen mikroskopisch mit einem Hämozytometer (Brand) ausgezählt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen dazu verwendet. Das auf das Hämozytometer zu pipettierende Volumen betrug 10 µl, 4 Felder wurden ausgezählt und die Werte gemittelt. Um auf die Konzentration in Zellen pro Milliliter zu kommen, musste der Wert unter zusätzlicher Berücksichtigung der verwendeten

Verdünnung mit  $10^4$  multipliziert werden, da sich unter einem Zählfeld ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$  befand.

### **Lebendzellzahlbestimmung von *K. petricola*-Kulturen**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von *K. petricola*-Zellen enthaltenden Lösungen wurden unterschiedliche Verdünnungen hergestellt und 50-100  $\mu\text{l}$  dieser auf MEA-Platten (MEB Festmedium) ausplattiert. Nach einer Inkubation für 7 d bei 25°C wurden die auf den Platten erkennbaren Kolonien ausgezählt und anhand dieser unter Berücksichtigung der Verdünnung auf die Zellzahl in der ursprünglichen Lösung geschlossen. Festproben wurden entweder in steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung geschüttelt oder in Stahlmahlbechern mit Mahlkugeln und einem definierten Volumen an Flüssigkeit (0,9%ige Natriumchloridlösung oder ein entsprechendes Medium) in der Schwingmühle (Retsch) homogenisiert, wenn nicht anders angegeben für 10 Minuten bei 30 Hz. Die restliche Prozedur erfolgte analog zu den Flüssigproben.

### **Abschätzung des Wachstums von *N. punctiforme***

Zur Abschätzung des Wachstums von *N. punctiforme* wurde der Chlorophyll a Gehalt entsprechender Proben gemessen. Von Flüssigproben wurde zweimal 1 ml für 1-5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in entsprechendem Volumen 90%igen Methanols aufgenommen. Nach 5-15 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde erneut bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand bzgl. der Absorption im Photometer bei 665 nm gegen eine Blindprobe aus 90% Methanol bei Verwendung einer Grundlinienkorrektur bei 750 nm gemessen. Festproben wurden direkt mit 90% Methanol überschichtet und im Dunkeln für 0,5-2 h inkubiert. Dann wurde ebenfalls vom Überstand 1 ml für die Absorptionsmessung analog zu den Flüssigproben verwendet; das Volumen an überschichtetem Methanol berücksichtigend musste der Absorptionswert für Festproben noch auf das Ausgangsvolumen umgerechnet werden. Ausgehend von einem Extinktionskoeffizienten von 78,74 l/g/cm für Chlorophyll a in 90% Methanol, wurde der erhaltene Absorptionswert mit 12,7 multipliziert, um nach [185] den Chlorophyll a Gehalt in  $\mu\text{g/ml}$  zu bekommen. Nach [186] kann aus dem Chlorophyll a Gehalt durch Multiplikation mit  $5,7 \cdot 10^6$  die Zellzahl für *N. punctiforme*-Zellen pro Milliliter abgeschätzt werden. Auf diese Art wurden sowohl die Zellzahlen von Ausgangskulturen für Inokula als auch die finalen Zellzahlen nach Beendigung von Experimenten abgeschätzt.

### **DNA-Extraktion nach Griffiths (2000)**

Für die Quantifizierung von Zellzahlen über deren DNA-Gehalte musste zunächst die DNA extrahiert werden, was nach einem modifizierten Protokoll nach Griffiths [187] geschah. Im Fall von Festproben wurde 1 g Material zur Extraktion verwendet, im Fall von Flüssigproben wie z.B. Zellkulturen von *K. petricola* oder *N. punctiforme* wurde je 1 ml der Flüssigprobe für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das komplette Pellet als Ausgangsmaterial für die Extraktion benutzt. Die weiteren Schritte waren folgende:

1. 1 g einer Festprobe bzw. das Pellet einer Flüssigprobe wurden in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß (neoLab) mit 1g Zirkonia/Silicabeads (Cole Parmer) mit einem Durchmesser von 0,1 mm eingewogen.
2. 600 µl modifizierter CTAB-Puffer wurden zugegeben und kurz gevortext.
3. 600µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben und kurz gemischt.
4. Die Proben wurden für 45 s im Ribolyser (Hybaid) bei einer Geschwindigkeit von 5 m/s aufgeschlossen und anschließend auf Eis gestellt. Ab hier wurde nur noch auf Eis gearbeitet.
5. Es wurde für 15 Minuten bei 12300 rpm und 4°C zentrifugiert.
6. Die wässrige, sich im Normalfall oben befindliche Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit dem gleichen Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt, es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12300 rpm und 4°C.
7. Die wässrige Phase (oben) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, mit dem doppelten Volumen an PEG/NaCl-Lösung gemischt und für 2 h bei 4°C zur Präzipitation der DNA inkubiert.
8. Die Probe wurde nun für 20 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert.
9. Der Überstand wurde abgegossen bzw. mit einer Pipette abgenommen.
10. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 rpm, der restliche Überstand wurde mit einer 20 µl oder 200 µl Pipette abgenommen.
11. Das Pellet wurde für 30 Minuten bei 30°C an der Luft trocknen gelassen und dann in 35 µl Millipore-Wasser aufgenommen; anschließend erfolgte bis zur weiteren Verwendung eine Lagerung bei -20°C

Verwendete Zentrifugen waren vom Typ 5430R oder 5415R (Eppendorf), Eis wurde durch einen Flockeneisbereiter (Hoshizaki) produziert.

### Quantifizierung von Zellzahlen über qPCR

Zur Abschätzung der Zellzahlen von *K. petricola* und *N. punctiforme* wurden teilweise quantitative Polymerasekettenreaktionen (qPCRs), über die DNA-Gehalte in den Proben quantifiziert werden konnten, verwendet. Die Quantifizierung der Proben unbekannter DNA-Konzentration erfolgte dabei relativ zu Proben bekannter DNA- und Zellkonzentrationen.

Proben bekannter DNA- und Zellkonzentration wurden folgendermaßen erhalten: Je 1 ml der gleichen Probe wurde einmal mit den konventionellen Methoden der Lebendzellzahlbestimmung (für *K. petricola*) bzw. der Bestimmung des Chlorophyll a Gehalts (für *N. punctiforme*) und einmal über die Bestimmung der DNA-Konzentration von nach dem modifizierten Protokoll von Griffiths [187] extrahierten DNA-Extrakten mit einem Nanodrop Modell 2000c (Qiagen) ermittelt. Diese Analysen wurden jeweils als Triplikat durchgeführt. Von den Extrakten bekannter DNA-Konzentrationen wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die unterschiedlich verdünnten Extrakte konnten für die qPCR zur Erstellung einer Eichgeraden verwendet werden.

Vor der Durchführung einer qPCR wurden die zu verwendenden Primer mittels einer konventionellen PCR auf ihre Tauglichkeit hin getestet. Die Pipettierschemata für die konventionellen PCRs sind in Tab.3, die Cyclerprogramme in Tab.4 aufgeführt. Die verwendeten Primer waren folgende:

1. *K. petricola*: Primerpaar NL1f(GC)/LS2r, Referenz [188]

NL1f(GC): 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGGGCGGGGGCC-  
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

LS2r: 5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3'

2. *N. punctiforme*: Primerpaar p23SrV\_f1/p23SrV\_r1, Referenz [189]

p23SrV\_f1: 5'-GGACAGAAAGACCCTATGAA-3'

p23SrV\_r1: 5'-TCAGCCTGTTATCCCTAGAG-3'

Tab.3: Pipettierschemata für PCRs zur Amplifikation der DNA von *K. petricola* und *N. punctiforme*.

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge pro Einzelreaktion (<i>K. petricola</i>-spezifische PCR)</b>	<b>Menge pro Einzelreaktion (<i>N. punctiforme</i>-spezifische PCR)</b>
Millipore-Wasser	40,5 µl	40,5 µl
Polymerase-Puffer (10X)	5 µl	5 µl
Vorwärtsprimer (20 µM)	1 µl	1 µl
Rückwärtsprimer (20 µM)	1 µl	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	0,5 µl
Template	1 µl	1 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	1 µl

Tab.4: Cyclerprogramme für PCRs zur Amplifikation der DNA von *K. petricola* und *N. punctiforme*, Schritte 2-4 wurden in 35 Zyklen durchlaufen.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur und Zeit für <i>K. petricola</i>-spezifische PCR</b>	<b>Temperatur und Zeit für <i>N. punctiforme</i>-spezifische PCR</b>
1) Initialdenaturierung	95°C für 240 s	-
2) Denaturierung	95°C für 60 s	94°C für 60 s
3) Annealing	52°C für 70 s	55°C für 60 s
4) Elongation, 2)-4) 35X	72°C für 120 s	72°C für 240 s
5) Finale Elongation	72°C für 480 s	72°C für 600 s

Die PCRs wurden in einer PCR-Box (Plas-Labs) zusammenpipettiert und in C1000<sup>TM</sup>/S1000<sup>TM</sup> Thermal Cyclern (Bio-Rad) laufen gelassen. Die verwendete DNA-

Polymerase mit entsprechendem Puffer war von der Firma Genaxxon. Es wurden unterschiedlich verdünnte DNA-Extrakte als Template verwendet.

Die so durchgeführten konventionellen PCRs wurden in 1%igen Agarosegelen auf ihren Amplifikationserfolg hin getestet. Die Gele wurden für 30 Minuten bei 100 V laufen gelassen lassen, für 15 Minuten mit 3fach konzentriertem GelRed™ (Genaxxon) gefärbt und im ChemiDoc™ XRS+ Geldokumentationssystem (Bio-Rad) dokumentiert.

Die qPCRs wurden in einem Real Time PCR Cycler CFX96 (Bio-Rad) laufen gelassen; ein iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), welcher bereits Polymerase, Puffer und dNTPs enthielt, wurde entsprechend folgendem Schema mit Primern und Template vereint:

- Millipore-Wasser	3,6 µl
- iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	5 µl
- Vorwärtsprimer	0,2 µl
- Rückwärtsprimer	0,2 µl
- Template	1 µl

Das Cyclerprogramm war folgendermaßen: einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95°C folgten 39 Zyklen mit einem Schritt bei 95°C für 5 s und einem Schritt bei 60°C für 45 s. Zusätzlich wurde eine Schmelzkurve im Anschluss an das Cyclerprogramm durchgeführt, wobei die Temperatur von 65°C auf 95°C in Schritten mit 5 s Laufzeit jeweils um 0,5°C pro Schritt erhöht wurde. Neben den zu testenden Proben unbekannter DNA-Konzentration wurden Proben mit folgenden bekannten Konzentrationen als Standards mit amplifiziert:

1. Für *K. petricola*: 100 ng/µl, 32 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl
2. Für *N. punctiforme*: 100 ng/µl, 35 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl

### **Standardbedingungen für Experimente mit dem Modellbiofilm**

Einige physikalische Parameter wurden für die meisten Experimente konstant gehalten, unter anderem z.B. auch für die wöchentlich umgesetzten Kulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme*. Daher werden für diese Arbeit an dieser Stelle Standardbedingungen definiert, die immer dann vorlagen, wenn darauf verwiesen wird. Die Standardbedingungen umfassten eine Temperatur von 25°C und eine Intensität der photosynthetisch aktiven Lichtstrahlung

von 90  $\mu\text{Mol}$  Photonen pro Quadratmeter pro Sekunde für 24 h/d. Die relative Luftfeuchte sowie der  $\text{CO}_2$ -Gehalt wurden nicht manuell variiert und lagen schätzungsweise bei 30-50% bzw. etwa 400 ppm. Da diese Bedingungen in Klimakammern des Typs Persival (Geneva Scientific) aufrecht erhalten werden konnten, erfolgten alle Experimente unter Standardbedingungen in diesen Klimakammern.

## 2.2.2 Wachstumsexperimente auf BG11/BG11<sub>0</sub> Festmedium

Zur vergleichenden Untersuchung von Einzel- und Mischkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* wurden verschiedene Wachstumstests auf BG11 und BG11<sub>0</sub> Festmedien mit einem pH von 6 unter Standardbedingungen (beschrieben in 2.2.1) durchgeführt. Um die Parameter Biomasse und Lebendzellzahl bzw. Chlorophyll a Gehalt quantitativ bestimmen zu können, wurden *a priori* gewogene Nitrozellulosemembranen (Roth) benutzt, die auf den Festmedien platziert wurden und für Nährstoffe durchlässig sind. Die Beimpfung mit den Biofilmkulturen erfolgte auf diese Membranen, welche *a posteriori* zur Biomassebestimmung nochmals gewogen bzw. zu Zellzahlanalysen verwendet werden konnten. Die Vorbereitung des Inokulums erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben, die abgeschätzten Startzellzahlen betragen  $10^5$  für *K. petricola* und  $2 \cdot 10^5$  für *N. punctiforme*.

1) Um einzugrenzen, welche Art von Einfluss vom jeweiligen Biofilmpartner ausgeht, wurde das Wachstum beider Biofilmpartner als Einzelkultur mit dem in der Mischkultur sowie in Anwesenheit von steril filtrierter Einzelkulturlösung des jeweils anderen Biofilmpartners verglichen. Der Versuch wurde auf runden Nitrozellulosemembranen mit einem Durchmesser von 90 mm durchgeführt, die auf BG11 Festmedien in Petrischalen mit einem Innendurchmesser von 90 mm platziert waren. Bei einigen Platten waren 10% des BG11 Festmediums durch eine steril filtrierte, 7 d alte Kultur des jeweiligen Biofilmantagonisten ersetzt. Das Sterilfiltrat sollte dabei eine Situation simulieren, in der nur ein Metabolitaustausch aber kein physischer Kontakt mit dem anderen Organismus möglich ist. Nach 22 d wurde der finale Wachstumszustand bzgl. *N. punctiforme* über den Chlorophyll a Gehalt, für *K. petricola* über eine Lebendzellzahlbestimmung quantifiziert. Eine Trockenbiomassebestimmung erfolgte für beide Organismen durch Wiegen nach Trocknung für 24 h im Trockenschrank (Memmert). Jede Probe wurde als Triplikat ( $n=3$ ) untersucht.

2) Um die vergleichende Entwicklung der Einzel- und Mischkulturen beider Biofilmpartner auch quantitativ über den gesamten Zeitraum analysieren zu können, wurden auf BG11 und BG11<sub>0</sub> Festmedien Wachstumskurven durchgeführt. Dazu wurden in mit entsprechendem Medium gefüllte Petrischalen mit einem Innendurchmesser von 90 mm je vier

Nitrozellulosemembranen mit einer Fläche von  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  gelegt; je zwei dieser Membranen wurden mit Einzelkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* beimpft, die anderen beiden mit Mischkulturen aus beiden Organismen, wobei je eine Mischkultur nur zur Analyse von *K. petricola*, die andere nur zur Analyse von *N. punctiforme* benutzt wurde. Insgesamt wurden 27 so behandelte Petrischalen für 22 d inkubiert, um zu 9 verschiedenen Zeitpunkten mit  $n=3$  Daten für Wachstumszustände zu erhalten. Es wurden der Chlorophyll a Gehalt (*N. punctiforme*) und die Lebendzellzahl (*K. petricola*) bestimmt.

### **2.2.3 Gesteinsbewuchs unter variierenden Witterungsbedingungen**

Für die Untersuchung von Gesteinsbewuchs unter variierenden Witterungsbedingungen wurden 5 Gesteine (siehe 2.1.1.1) mit dem Modellbiofilm beimpft und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen inkubiert. Bzgl. der physikalischen Parameter wurden teilweise Standardbedingungen (siehe 2.2.1), teilweise veränderte Bedingungen verwendet. Die Kultivierungsbedingungen umfassten Schüttelkulturen mit darin deponierten Gesteinen, feuchte Kammern und semikontinuierliche Kulturen in einem Durchfluss-System.

Die Materialien lagen bereits im Vorfeld als zugeschnittene quadratische Blöcke vor; für Baumberger Sandstein, Ettringer Tuff und Savonnières Kalkstein waren diese etwa  $5 \times 5 \times 1 \text{ cm}^3$ , für Postaer Sandstein  $5,5 \times 5,5 \times 1 \text{ cm}^3$  und für Marmor  $2 \times 2 \times 1 \text{ cm}^3$  groß. Mit einem Hammer und einem Meißel wurden alle Gesteinsblöcke außer den Marmorblöcken auf eine Größe zerkleinert, die ungefähr den Marmorblöcken entsprach; die so zerkleinerten Gesteinsblöcke wurden für die in 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschriebenen Experimente benutzt. Generell war die Dicke der Blöcke sehr weit gestreut und uneinheitlich, es wurde versucht, innerhalb eines vergleichenden Experiments jeweils Gesteinsblöcke zu verwenden, die in ihren Dicken möglichst ähnlich waren.

Die pH-Werte der hier verwendeten Gesteine wurden folgendermaßen gemessen: Jeweils 1 g gemörserten Gesteinsmehls wurden mit 10 ml 1 N KCl-Lösung bzw. 10 ml Millipore-Wasser versetzt, geschüttelt und 30 Minuten stehen gelassen. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte dann mit einer pH-Mikroelektrode, die an ein pH-Meter (Sartorius) angeschlossen war. Zusätzlich erfolgte eine Messung der pH-Werte an der Oberfläche der Gesteine mit einem pH-Meter 763 Multi-Calimatic (Knick).

### **2.2.3.1 Wachstum in Schüttelkultur bei unterschiedlichen Temperaturen**

Mischkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* wurden in BG11 Flüssigmedium mit einem pH von 6 in 300 ml Erlenmeyerkolben mit darin deponierten Gesteinsblöcken unter folgenden Bedingungen bei 100 rpm schüttelnd inkubiert:

1. Unter Standardbedingungen (2.2.1) für 22 d
2. Unter Standardbedingungen mit einer Veränderung der Temperatur auf 15°C für 22 d
3. Nach anfänglichen 3 d Inkubation bei 35°C für die weiteren 19 d unter Standardbedingungen

Die Anzahl der Gesteinsblöcke pro Erlenmeyerkolben betrug vier, für diesen Versuch verwendete Gesteine umfassten Baumberger Sandstein, Ettringer Tuff, Marmor und Savonnières Kalkstein, welche als Triplikate untersucht wurden. Die Vorbereitung des Inokulums erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben, die abgeschätzten Startzellzahlen betragen für beide Biofilmpartner jeweils  $2,5 \cdot 10^5$ . Das Inokulum wurde zuerst auf die Gesteinsblöcke pipettiert, die Nährlösung wurde später zugegeben, nachdem die Zellen des Inokulums sich auf der Gesteinsoberfläche absetzen konnten; der Flüssigkeitsstand lag im Ruhezustand knapp unterhalb der Gesteinsoberfläche und benetzte diese während des Schüttelvorgangs regelmäßig.

Zur Determination des finalen Wachstumszustands wurde der Chlorophyll a Gehalt für *N. punctiforme* und die Lebendzellzahl für *K. petricola* ermittelt (siehe 2.2.1).

### **2.2.3.2 Wachstum unter dis- und semikontinuierlichen Bedingungen**

Zur Untersuchung von Gesteinsbewuchs unter dis- und semikontinuierlichen Bedingungen wurden alle 5 in 2.1.1.1 beschriebenen Gesteine verwendet, die Experimente erfolgten unter Standardbedingungen (2.2.1) für einen Zeitraum von 28 d. Die Vorbereitung des Inokulums erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben, die abgeschätzten Startzellzahlen betragen jeweils  $1 \cdot 10^6$  für *K. petricola* und *N. punctiforme*.

### **Feuchte Kammer zur Etablierung diskontinuierlicher Bedingungen**

Zur Realisierung der diskontinuierlichen Bedingungen wurde das Prinzip der feuchten Kammer verwendet, es ist in [190] beschrieben. Hierzu wurden in Petrischalen mit einem

Innendurchmesser von 90 mm Filterpapiere mit einem Durchmesser von 90 mm gelegt, welche mit Millipore-Wasser befeuchtet wurden. Anschließend wurden darin die entsprechenden Steine deponiert und mit dem Modellbioilm beimpft. Alle 3 d wurde das Filterpapier erneut mit Millipore-Wasser befeuchtet. Eine solche feuchte Kammer ist in Abb.2 dargestellt.

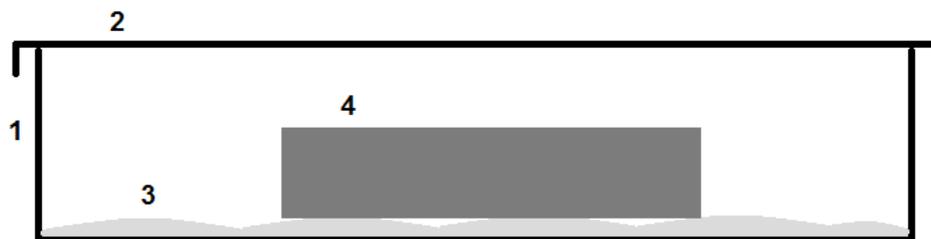


Abb.2: Schema einer feuchten Kammer. In ein Probengefäß (1) wird ein Filterpapier (3) gelegt, auf welchem die Probe (4), in diesem Fall ein Gesteinsblock (mit Biofilm), deponiert wird. Das Filterpapier wird in regelmäßigen Abständen unter aseptischen Bedingungen (z.B. unter einer Sterilwerkbank) mit Flüssigkeit getränkt. Durch einen Deckel (2) ist das Probengefäß (1) so verschlossen, dass keine Kontamination durch Mikroorganismen oder größere Partikel aber ein Gasaustausch stattfinden kann. Dies ist z.B. im Fall einer Petrischale gegeben.

### **Durchfluss-System zur Etablierung semikontinuierlicher Bedingungen**

Zur Realisierung der semikontinuierlichen Bedingungen wurde mit Hilfe der Firma Durakult GmbH (Berlin) ein Durchfluss-System entwickelt, das eine automatisierte und beliebig einstellbare tropfenweise Zugabe von Flüssigkeit bzw. Nährlösung auf die Gesteinsblöcke erlaubte. Ein Schema dieses Durchfluss-Systems ist in Abb.3 gezeigt.

Das System bestand aus Glasbehältern (Duran), die über Silikonschläuche miteinander und mit einer Vakuumpumpe verbunden waren. Durch die Vakuumpumpe wurde Druckluft in einen Behälter mit einem Medienreservoir gepumpt; dadurch wurde aus diesem Medium durch Silikonschläuche in die Probenbehälter getropft, aus denen es durch Abflussschläuche in Abfallgefäße abfloss. Kurz vor dem Zulauf aus dem Medienreservoir in die Probenbehälter durchliefen die Silikonschläuche Druckventile, die im Normalzustand geschlossen waren und daher den Weiterfluss des Mediums inhibierten. Die Ventile öffneten sich über eine Funkuhr gesteuert alle 45 Minuten für einen Zeitraum von 3 Sekunden, in

denen das Medium in die Probenbehälter tropfen konnte. Diese Konstruktion ermöglichte, dass aus dem Medienreservoir mehrere parallele Probenbehälter gleichmäßig mit jeweils gleichen Flüssigkeitsvolumina betropft werden konnten, da bei geschlossenen Ventilen das Medium jederzeit die gleiche Distanz von den Ventilen zu den jeweiligen Probenbehältern hatte. Unmittelbar nach dem Öffnen der Ventile wurde somit überall auf gleiche Weise das gleiche Volumen in die Probenbehälter getropft. Ohne Verwendung von Ventilen bestünde die Gefahr, dass das Medium aus dem Medienreservoir unterschiedlich schnell durch unterschiedliche Schläuche in verschiedene Medienbehälter gepumpt würde und somit nicht überall die gleichen Tropfbedingungen vorlägen.

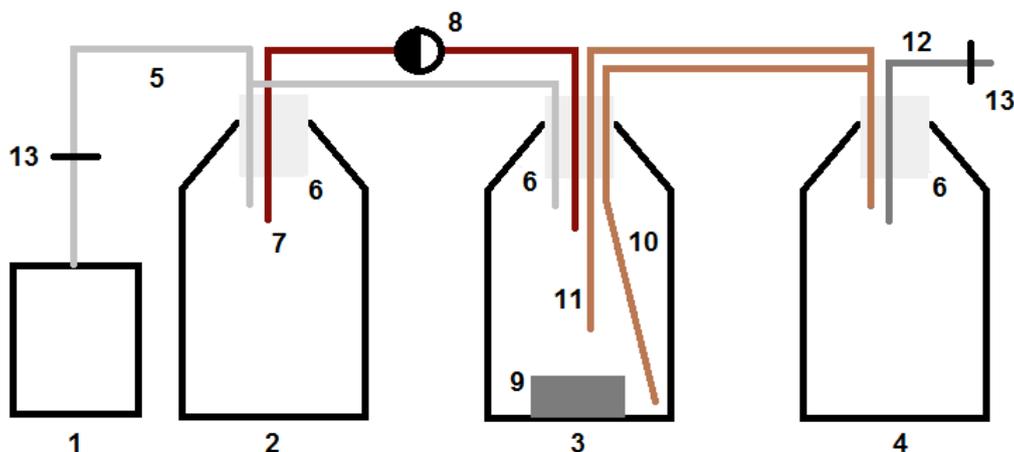


Abb.3: Schema des verwendeten semikontinuierlichen Durchflusssystems. Durch eine Vakuumpumpe (1) wird Druckluft durch einen Silikonschlauch (5) erst über einen Filter (13) sterilfiltriert und dann in ein Medienreservoir (2) gepumpt. Dadurch wird aus diesem Medienreservoir Medium/Nährlösung über einen weiteren Silikonschlauch (7) in das Probengefäß (3) gedrückt, wo es auf einen dort deponierten Gesteinsblock mit Biofilm (9) tropft. Die tropfenweise Zugabe ist dadurch gewährleistet, dass sich das Medium zunächst zu einem normalerweise geschlossenen Ventil (8) bewegt, welches sich Funkuhr-gesteuert alle 45 Minuten für 3 s öffnet und Medium entlässt. Der Abfluss des Mediums erfolgt über Schläuche entweder unterhalb (10) oder oberhalb (11) der Gesteinsoberfläche, wodurch tropfenweise Medienzugabe gewährleistet oder Überflutung simuliert werden können. Der jeweils nicht benutzte Abfluss wird mit einer Klemme verschlossen. Über die Abfluss-Schläuche (10 oder 11) gelangt das Medium in den Abfallbehälter (4). Das ganze System steht durch die Verwendung von Gummistopfen in den Öffnungen der Behälter (6) unter Druck; ein Druckausgleich erfolgt erst über einen abführenden Schlauch (12) im Abfallbehälter. Im Experiment werden 4 parallele Probengefäße aus dem Medienreservoir gespeist.

Da dieses Durchflusssystem über Druckluft funktionierte, musste gewährleistet sein, dass das Medienreservoir und die Probenbehälter ständig unter Druck standen; eine Druckentlastung erfolgte erst über eine Öffnung in den Abfallbehältern. Sämtliche Behälter waren daher mit Gummistopfen verschlossen. Um die Zufuhr von Druckluft und Medium

sowie den Abfluss von Medium bzw. Kultur zu ermöglichen, waren die Gummistopfen durchbohrt. In den Bohrungen waren kurze Glasstücke eingesetzt, die dem Druck des Gummistopfens standhielten und durch letzteren nach außen abgedichtet waren; diese Glasstücke waren beidseitig mit Schläuchen verbunden.

Ein Schlauch führte von der Vakuumpumpe in das Medienreservoir und setzte dieses somit durch die Zufuhr von Luft unter Druck. Da die von der Pumpe generierte Luft *per se* nicht steril war, durchlief sie vor dem Eintritt in das Medienreservoir zwei in Reihe geschaltete Sterilfilter (Schleicher & Schuell). Das Durchfluss-System wurde für vier parallele Probenbehälter konzipiert; aus dem Medienreservoir liefen demnach vier Schläuche zu den vier parallelen Probenbehältern.

Die Probenbehälter besaßen jeweils drei Schläuche in ihren verschließenden Gummistopfen: Durch einen Schlauch wurde das vom Medienreservoir ankommende Medium direkt auf das mittig am Boden des Probenbehälters befindliche, zu testende Gestein mit dem Biofilm getropft, zwei Schläuche dienten dem Abfluss des Mediums, einer knapp unter der Höhe des Gesteins und einer deutlich über dem Gestein befindlich. Der niedrigere Abfluss-Schlauch wurde verwendet, um kontinuierliche Tropfbedingungen aufrecht zu erhalten; der sich auf dem Gestein befindliche Biofilm konnte somit fortwährend mit Medium versorgt werden und hatte dabei Kontakt zur Luft. Der höhere Abfluss-Schlauch konnte zur Simulation einer Überflutung bzw. starken Regens verwendet werden; in diesem Fall musste der niedrigere Abfluss-Schlauch mittels einer Wilo-Klemme (neoLab) blockiert werden. Damit der Druck der Vakuumpumpe bis zu den Abfallgefäßen aufrechterhalten werden konnte, mussten die jeweils nicht verwendeten Abflüsse der Probenbehälter generell abgeklemmt werden. Die Abfluss-Schläuche führten in die Abfallgefäße, welche jeweils noch mit steriler Watte gestopfte, ausführende Schläuche besaßen; diese ermöglichten eine Druckentlastung am Ausgang des Systems, eine Kontamination wurde durch die als Filter wirkende Watte verhindert.

Das System war modular aufgebaut: Das Medienreservoir sowie alle Probenbehälter konnten vom System abgekoppelt werden. Dies wurde über abflammbare Inoxverbindungen ermöglicht, die getrennt und zusammengesteckt werden konnten und innerhalb der zu- und abführenden Schläuche für die Probenbehälter und das Medienreservoir integriert waren. Im zusammengesteckten Zustand wurden sie doppelt mit Aluminiumfolie umwickelt. Im Fall einer Trennung der Inoxverbindungen zwischen einem Modul und dem gesamten Durchfluss-System wurden die getrennten Inoxverbindungen für den Zeitraum der Trennung mit sterilen, blind endenden Inoxverbindungen verschlossen, welche mit Klemmen blockiert waren. So konnte ein abgekoppeltes Modul unter aseptischen Bedingungen in einer

unsterilen Umgebung transportiert werden; das Durchfluss-System selbst war gleichzeitig trotz der Abkopplung eines Moduls vor einer Kontamination bzw. Öffnung des Systems geschützt. Dieses Abkoppeln wurde benutzt, wenn das Medienreservoir ausgetauscht bzw. aufgefüllt werden musste oder auch zum Animpfen der Probenbehälter. Beim Abkoppeln wurden die entsprechenden Inoxverbindungen jeweils durch einen tragbaren Campingz-Brenner (Coleman) abgeflammt.

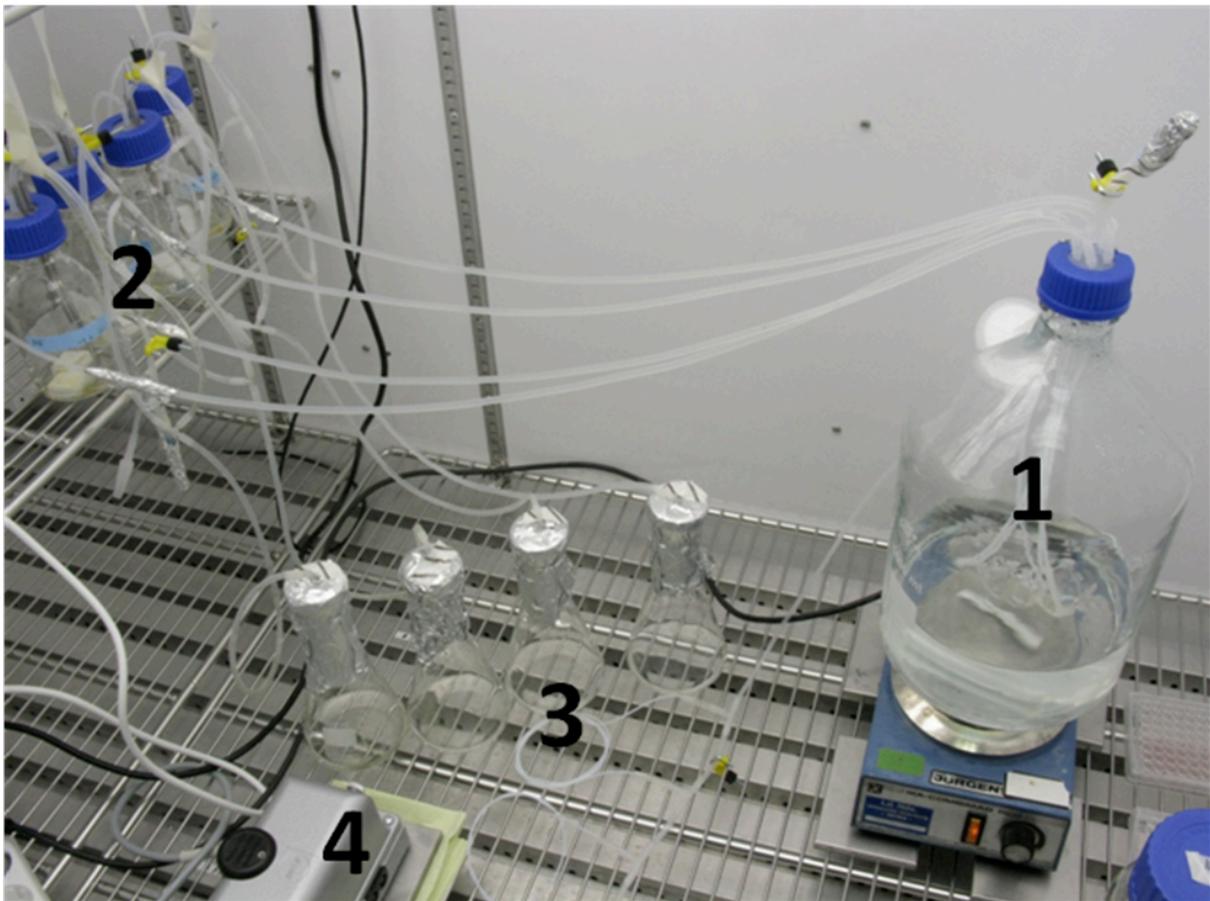


Abb.4: Photographische Aufnahme des semi-kontinuierlichen Durchfluss-Systems. Oben: Medium wird durch eine Vakuumpumpe (4) aus einem Medienreservoir (1) in die Probenbehälter (2) gepumpt und gelangt von dort in Abfallbehälter (3). Unten: Vor dem Eintritt in die Probenbehälter (2) durchlaufen die Medium transportierenden Silikonschläuche Druckventile (1), die im Normalzustand geschlossen sind und Funkuhr-gesteuert alle 45 Minuten für 3 s geöffnet werden.

Die Inokulation der Probenbehälter fand unter einer Sterilwerkbank (BioAir) statt; dazu wurde das Inokulum in das geöffnete Probengefäß auf das jeweilige Gestein pipettiert. Um Standardbedingungen zu gewährleisten, war das gesamte Durchfluss-System während des Experiments in einer Persival Klimakammer (Geneva Scientific) positioniert; dies ist in Abb.4 gezeigt.

Die Entnahme der Gesteine am Ende des Versuchs zur weiteren Analyse erfolgte ebenfalls unter einer Sterilwerkbank (BioAir) mit abgeflamten Pinzetten; die Gesteine wurden entweder direkt weiter behandelt wie z.B. für die Wachstumsquantifizierung oder in Petrischalen, die mit Parafilm abgedichtet wurden, gelagert. In Petrischalen konnten die Proben zur mikroskopischen Analyse zu den entsprechenden Standorten transportiert werden.

### **Quantifizierung des Wachstums**

Die Quantifizierung des Wachstums wurde für diese Experimente über eine Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.2.1) für *K. petricola* und über eine Bestimmung des Chlorophyll a Gehalts (siehe 2.2.1) für *N. punctiforme* durchgeführt.

### **Mikroskopische Analyse**

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM für engl. „confocal laser scanning microscopy“) wurde in Kooperation mit Thomas R. Neu am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ, Magdeburg) durchgeführt.

Dabei wurde eine Lektin-Bindungs-Analyse verwendet, die auf der spezifischen Bindung von Lektinen an EPS-Glykokonjugate in Biofilmen beruht: Zunächst wurden 74 Lektine auf mögliche spezifische Bindungen an Strukturen in den Zellwänden oder in den Biofilmmatrices von Einzel- und Mischkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* getestet. Dazu wurden entsprechende Einzel- und Mischkulturen auf Deckgläschen in feuchten Kammern mit jeweils  $0,5 \cdot 10^5$  Zellen des entsprechenden Organismus angeimpft (Vorbereitung der Zellen wie in 2.2.1 beschrieben) und für 34 d unter Standardbedingungen (2.2.1) inkubiert. Alle drei Tage wurde das Filterpapier der feuchten Kammer neu befeuchtet. Die verwendete Nähr- bzw. Befeuchtungslösung war BG11 mit einem pH von 6. Die getesteten Lektine sind in Tab.5 verzeichnet, sie waren jeweils mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, TRITC, A488 und A568 konjugiert.

Tab.5: Liste der an Einzel- und Mischkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* getesteten Lektine mit Informationen zu den Organismen, aus denen sie isoliert wurden, und den Firmen, von denen sie bezogen wurden.

<b>Abkürzung für Lektin</b>	<b>Isoliert aus</b>	<b>Herstellende Firma</b>
AAA	<i>Anguilla anguilla</i>	Sanbio (Mountain View, CA, USA)
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Vector (Burlingame, CA, USA)
ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Sanbio
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Sanbio
AIA	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Sanbio
AMA	<i>Arum maculatum</i>	Sanbio
APP	<i>Aegopodium podagraria</i>	Sanbio
ASA	<i>Allium sativum</i>	Sanbio
BDA	<i>Bryonia dioica</i>	Sanbio
BPA	<i>Bauhinia purpurea</i>	Sanbio
CA	<i>Colchicum autumnale</i>	Sanbio
CAA	<i>Caragana aborescens</i>	Sanbio
Calsepa	<i>Calystega sepium</i>	Sanbio
CCA	<i>Cancer antennarius</i>	Sanbio
Co	<i>Codium fragile</i>	Sigma
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Sigma
CPA	<i>Cicer arietinum</i>	Sanbio
CSA	<i>Cytisus scoparius</i>	Sanbio
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	Sigma
DGL	<i>Dioclea grandiflora</i>	Sanbio
DAS	<i>Datura stramonium</i>	Sanbio
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	Sanbio
Ecor	<i>Erythrina corallodendron</i>	Sigma
EEA	<i>Euonymus europaeus</i>	Sanbio

<b>Abkürzung für Lektin</b>	<b>Isoliert aus</b>	<b>Herstellende Firma</b>
GHA	<i>Glechoma lederacea</i>	Sanbio
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	Sanbio
GS-I	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Sigma
HAA	<i>Helix aspersa</i>	Sanbio
HHA	<i>Amaryllis sp.</i>	Sanbio
HMA	<i>Homarus americanus</i>	Sanbio
HPA	<i>Helix pomatia</i>	Sigma
IAA	<i>Iberis amara</i>	Sanbio
IRA	<i>Iris sp.</i>	Sanbio
LAA	<i>Laburnum alpinum</i>	Sanbio
LAL	<i>Laburnum anagyroides</i>	Sanbio
LBA	<i>Phaseolus lunatus</i>	Sanbio
LcH	<i>Lens culinaris</i>	Sanbio
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Sigma
LFA	<i>Limax flavus</i>	Sanbio
Lotus	<i>Tetragonolobus purpurea</i>	Sigma
LPA	<i>Limulus polyphemus</i>	Sanbio
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Sanbio
MIA	<i>Mangifera indica</i>	Sanbio
MNA-G	<i>Morniga sp.</i>	Sanbio
MOA	<i>Marasmiium oreades</i>	Sanbio
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	Sanbio
NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Sanbio
PAA	<i>Perseu americana</i>	Sanbio
PA-I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sigma
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sanbio

<b>Abkürzung für Lektin</b>	<b>Isoliert aus</b>	<b>Herstellende Firma</b>
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sanbio
PMA	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Sanbio
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Sanbio
PPA	<i>Ptilota plumosa</i>	Sigma
PSA	<i>Pisum sativum</i>	Sigma
PSL	<i>Polyporus squamosus</i>	Sanbio
PTA	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Sanbio
PWA	<i>Phytolacca americana</i>	Sanbio
RPA	<i>Robinia pseudoaccacia</i>	Sanbio
RTA	<i>Trifolia repens</i>	Sanbio
SBA	<i>Glycine max</i>	Sanbio
SJA	<i>Sophora japonica</i>	Sanbio
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sanbio
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	Sanbio
TKA	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Sanbio
TL	<i>Tulipa sp.</i>	Sanbio
UDA	<i>Urtica dioica</i>	Sanbio
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	Sigma
VFA	<i>Vicia faba</i>	Sanbio
VGA	<i>Vicia graminea</i>	Sanbio
VRA	<i>Vigna radiata</i>	Sanbio
VVA	<i>Vicia villosa</i>	Sanbio
WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	Sanbio
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	Sigma

Für die Analyse der Mischkulturen auf den Gesteinen wurden die Lektine verwendet, die in den Vorversuchen am besten funktioniert hatten:

1. Für Zellen von *K. petricola*: UDA, ursprünglich isoliert aus *Urtica dioica*, beschrieben in [191]
2. Für Zellen von *N. punctiforme*: LEA, ursprünglich isoliert aus *Lycopersicon esculentum*, beschrieben in [192]
3. Für EPS von *N. punctiforme*: AAL, ursprünglich isoliert aus *Aleuria aurantia*, beschrieben in [193]

Die beschriebenen Lektine wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert; teilweise wurde für die *N. punctiforme*-Zellen auf deren Autofluoreszenz und für die *K. petricola*-Zellen auf eine Calcofluor-White-Färbung (beschrieben in [194], [195]) zurückgegriffen. Die Färbung der jeweiligen Proben mit der entsprechenden Lektin-Lösung erfolgte für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur, danach wurde dreifach mit 1:10 verdünnter BG11 Nährlösung gewaschen. Die Herstellung der Lektin-Fluorophor-Konjugate bzw. deren Konzentrationen erfolgte nach den Standards des UFZ durch Ute Kuhlicke, Details dazu und allgemein zur Lektin-Bindungsanalyse sind in [196] beschrieben.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem TCS SP5X Mikroskop (Leica) erstellt.

### **Biochemische Analyse der EPS**

Zur biochemischen Charakterisierung der EPS in den Biofilmen wurden HPLC-MS-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die EPS von den restlichen Bestandteilen des Biofilms entfernt und hydrolysiert, um möglichst Monosaccharide zu erhalten. Die relativen Quantitäten einzelner Monosaccharide sollten in den unter verschiedenen Bedingungen gewachsenen Biofilmen verglichen werden.

Die Extraktion der EPS und damit die Trennung von den restlichen Bestandteilen des Biofilms wurde folgendermaßen nach [197] durchgeführt:

1. Der Biofilm wurde mit einem sterilen Skalpell vom Gestein abgekratzt, unter aseptischen Bedingungen in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und mit 200 µl 2%iger EDTA-Lösung versetzt.
2. Nach schüttelnder Inkubation bei 4°C und 500 rpm für 3 h wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und mit 800 µl 100% Ethanol (p.a.) versetzt.

3. Nach Inkubation über Nacht wurde bei 14000 rpm für eine Stunde zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals zweimal mit 70% Ethanol (p.a.) gewaschen (je 1 h Zentrifugation bei 14000 rpm).
4. Das resultierende Pellet wurde in 200 µl Millipore-Wasser aufgenommen, für 1 h bei 4°C schüttelnd (500 rpm) inkubiert und über einen 0,2 µm Filter (Th. Geyer GmbH, Renningen) in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf) gefiltert. So wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Einige Proben wurden nach Schritt 2 nicht mit Ethanol gewaschen sondern mit einem Dialyseschlauch aus Zellulosehydrat (Reichert Chemietechnik GmbH, Heidelberg) dialysiert.

Das übrig gebliebene Pellet des Biofilms wurde getrocknet, um über eine Gewichtsbestimmung die Trockenbiomasse der Proben abschätzen zu können. Die Polysaccharide wurden nach [198] hydrolysiert. 20 bzw. 180 µl so behandelte Proben wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) mit 0,5 bzw. 1,5 ml 0,75 M Trifluoressigsäure versetzt und im geschlossenen Gefäß für 8 h bei 110°C inkubiert. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure über Nacht bei 74°C (und geöffnetem Reaktionsgefäß) abdampfen gelassen. Die so erhaltenen Pellets wurden in 50 µl eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (1:1) aufgenommen und per HPLC-MS gemessen. Das verwendete HPLC-Gerät mit der Seriennummer 1100 und das Massenspektrometer mit der Seriennummer 6130 waren Produkte der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Die verwendete Säule für die Auftrennung der Zucker innerhalb des HPLC-Gerätes war eine SeQuant® 3,5 µm ZIC®-HILIC Säule mit einer 5 µm ZIC HILIC Vorsäule (Merck).

Zur möglichen Quantifizierung der durch die Hydrolyse erhaltenen Monosaccharide sollte ein Vergleich mit bekannten Quantitäten von den in Tab.6 dargestellten Einfachzuckern stattfinden.

Tab.6: Liste der Einzelzucker, die als Standards zur vergleichenden Quantifizierung der Monosaccharid-Zusammensetzung der EPS in unterschiedlich kultivierten Biofilmen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* dienen sollten.

Monosaccharid	Formel	Liefernde Firma
Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	Merck
Dulcit	$C_6H_{14}O_6$	Merck
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	Merck
Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma

Monosaccharid	Formel	Liefernde Firma
Galacturonsäure	$C_6H_{10}O_7$	Merck
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Merck
Glucuronsäure	$C_6H_{10}O_7$	Sigma
myo-Inositol	$C_6H_{12}O_6$	Merck
Mannose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	Sigma
Rhamnose	$C_6H_{12}O_5$	Applichem
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	Sigma
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	Janssen (Neuss)

## 2.2.4 Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen

Zur vergleichenden Untersuchung der Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen wurden alle 5 in 2.1.1.1 beschriebenen Gesteine mit Mischkulturen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* beimpft. Die Experimente erfolgten unter Standardbedingungen (2.2.1) in Schüttelkulturen (wie in 2.2.3.1) in BG11-Medium (pH 6) für einen Zeitraum von 59 d. Die Vorbereitung des Inokulums erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben, die abgeschätzten Startzellzahlen betragen jeweils  $1 \cdot 10^5$  für beide Biofilmpartner. Nach der Inkubation in Klimakammern wurden die Gesteinsbiofilme für 15 Minuten bei 121°C feuchter Hitze autoklaviert, um eine Verdichtung der Biofilme auf dem Gestein zu erwirken, wie sie auch in Stromatolithen vorliegt.

Zur Analyse der in den Biofilmen angereicherten Elemente wurden Querschnittpräparate von diesen hergestellt und daraus Dünnschliffe gemacht. Die Dünnschliffpräparate wurden mit einer Mikrosonde des Typs JEOL JXA 8200 Superprobe (Jeol) untersucht. Dabei wurden qualitative Bestandsaufnahmen der jeweiligen Gesteinsbiofilme und des darunter liegenden Gesteins gemacht; zudem wurde per EDS-Messung die quantitative Verteilung der Elemente Aluminium, Calcium, Chlor, Kupfer, Magnesium, Natrium, Phosphor und Schwefel an mindestens sechs unterschiedlichen Stellen in den Biofilmen gemessen. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit dem Arbeitsbereich Mineralogie-Petrologie der FU Berlin durchgeführt, sämtliche Analysen fanden dort statt.

## **2.2.5 Verwitterung von Gesteinen**

Für die Untersuchung von Gesteinsverwitterung wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt:

1. In einem kontinuierlichen Durchfluss-System wurden Granit, Albit und Mikroklin (siehe 2.1.1.2) für 180 d in An- und Abwesenheit des Modellbiofilms inkubiert.
2. In Batch-Kulturen wurden verschiedene Minerale (siehe 2.1.1.3) einzeln für 60 d in An- und Abwesenheit des Modellbiofilms inkubiert.

Die Experimente fanden jeweils unter Standardbedingungen (2.2.1) statt.

### **2.2.5.1 Verwitterung von Granit, Albit und Mikroklin**

Die Verwitterung von Granit, Albit und Mikroklin wurde in einem Durchfluss-System durchgeführt, welches prinzipiell auf Säulenversuchen nach DIN 19528 basiert [199]. Es wurden allerdings einige Modifikationen vorgenommen.

#### **Vorbereitung der Gesteine**

Die Gesteine (2.1.1.2) wurden mit einem Backenbrecher (BB 300, Retsch GmbH, Haan) zerkleinert und anschließend auf eine Korngröße von 1-6 mm hin gesiebt. Nachdem sie dann mit Millipore-Wasser gewaschen wurden, um die an den 1-6 mm großen Körnern anhaftende Feinstaubfraktion geringerer Korngröße zu entfernen, erfolgte eine Lufttrocknung für 7 d. Die getrockneten Gesteinskörner wurden nun mit einem Rotationsprobenteiler (PT 100, Retsch GmbH) homogenisiert und dann gleichmäßig auf Glasbehälter aufgeteilt, um zu gewährleisten, dass in allen Parallelproben alle noch vorhandenen Korngrößen im gleichen Verhältnis zueinander vorliegen. Zusätzlich wurden einige etwa 2\*1\*1 cm<sup>3</sup> große Stücke, die beim Zerkleinern mit dem Backenbrecher anfielen, für das Experiment verwendet; einige dieser größeren Stücke wurden angeschliffen. In jede Parallelprobe des finalen Experiments wurden mit den 1-6 mm großen Körnern (etwa 750-800 g pro Probe) zusammen zwei dieser größeren Gesteinsstücke deponiert, ein angeschliffenes und ein ungeschliffenes. Diese größeren Gesteinsstücke sollten für Untersuchungen mit der Mikrosonde herangezogen werden.

## **Durchfluss-System zur Untersuchung der Gesteinsverwitterung**

Die finalen Probengefäße waren behrotest® Glassäulen (Behr) mit beidseitigen GL 45 Verschraubungen. Die Glassäulen wurden mit einfach durchbohrten Schraubkappen (Duran) verschlossen, in die PTFE-Einsätze (Behr) gesteckt wurden. Die PTFE-Einsätze hatten eine etwa 4 mm breite Durchbohrung und waren nach außen hin mit einem System aus Silikonschläuchen (VWR International) verbunden. Im Inneren der Säulen wurden an beiden Enden für Mikroorganismen impermeable Metrigard® Glasfaserfilter (VWR International) mit einer Porengröße von 0,5 µm eingesetzt, um ein Verstopfen der zu- und abführenden Schläuche mit Zellen zu verhindern und gleichzeitig den Durchfluss von Nährlösung zu ermöglichen. Die Filter wurden mit zentral durchbohrten Silikondichtungsringen (Duran) an den PTFE-Einsätzen fixiert; dies diente nicht nur der Abdichtung der Randbereiche der Säulen zwischen den GL 45 Verschraubungen und den PTFE-Einsätzen nach außen sondern auch dem Schutz der Filter vor dem sich innerhalb der Säulen befindlichen Gestein. Eine Skizze einer solchen Glassäule mit allen an den Öffnungen befindlichen Zusatzteilen ist in Abb.5 gezeigt.

Das Schlauchsystem verband die Probenbehälter mit Nährlösungsgefäßen in einem geschlossenen Kreislauf, wobei über eine Peristaltikpumpe des Typs ICP12 (IDEX) die Nährlösung aus den Nährlösungsgefäßen von oben in die Probenbehälter gepumpt wurde und diese am unteren Ende wieder in Richtung Nährlösungsgefäße verließ. Eine Skizze der beschriebenen Apparatur ist in Abb.6 gezeigt.

Die Nährlösungsgefäße wurden mit in die Öffnung eingedrückten Gummistopfen (Labmarket) verschlossen. Die Gummistopfen waren zweifach durchbohrt, um den Zu- und Abfluss der Nährlösung zu ermöglichen. Dieser erfolgte durch Glasrohre (Duran), welche in die Bohrungen der Gummistopfen gesteckt wurden und außerhalb der Nährlösungsgefäße mit dem Schlauchsystem verbunden waren. Ein Glasrohr diente dem durch die Peristaltikpumpe induzierten Abfluss der Nährlösung in die Probengefäße, das andere dem Zufluss aus den Probengefäßen in die Nährlösungsgefäße.

Die Peristaltikpumpe wurde mit einer Pumpgeschwindigkeit von 5,4 ml/h betrieben, das in den Nährlösungsbehältern vorhandene Volumen von 1 l an Nährlösung passierte die Probengefäße in 185 h und durchlief sie während des Verwitterungsexperimentes 20fach. In dem Bereich, in dem das Schlauchsystem in die Peristaltikpumpe eingespannt war, wurden Pharmed-2Stopper-Schläuche (VWR International) verwendet, welche über Verbindungsstücke (neoLab) mit den Silikonschläuchen verbunden waren. Die Pharmed-Schläuche waren gegenüber den peristaltischen Pumpbewegungen resistenter und konnten durch die zwei integrierten Stopper in die Peristaltikpumpe eingespannt werden.

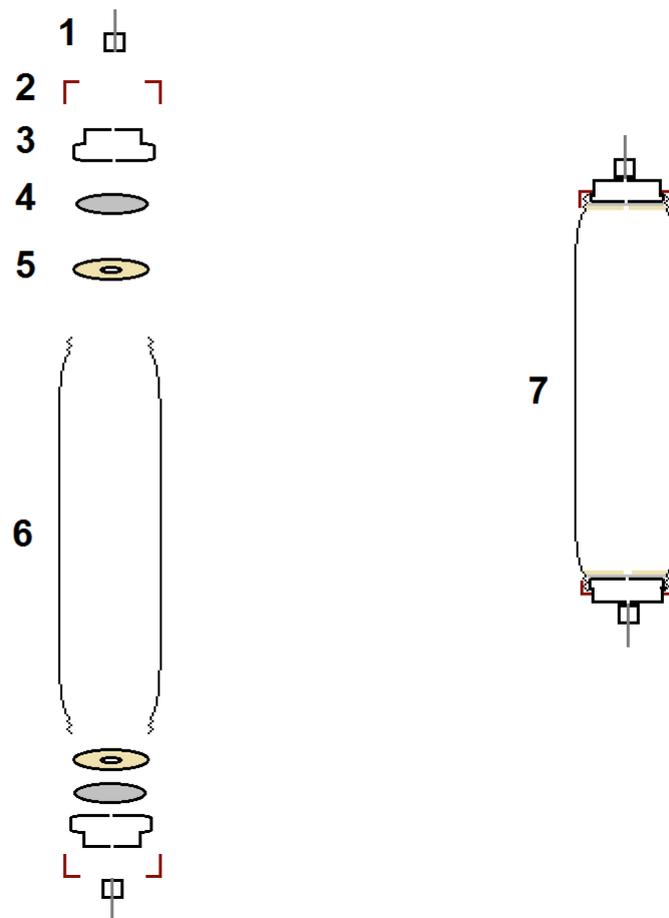


Abb.5: Schema der verwendeten Probengefäße im Durchfluss-System zur Untersuchung von Gesteinsverwitterung. Eine Glassäule (6) wird mit einem durchbohrten Schraubdeckel (2) verschlossen, in welchen ein Tefloneinsatz (3) und eine in diesen Tefloneinsatz eindrehbare Gewindeverbindung (1) eingesetzt sind. Die Gewindeverbindung kann mit dem Schlauchsystem verbunden werden. Sowohl Gewindeverbindung (1) als auch Tefloneinsatz (3) besitzen eine 4 mm breite Durchbohrung, um den Durchtritt von Medium zu ermöglichen. Unter dem Tefloneinsatz befindet sich ein Glasfaserfilter (4) mit einer Porengröße von 0,5  $\mu\text{m}$ , um den Austritt von Mikroorganismen aus den Säulen in das Schlauchsystem zu verhindern. Der Filter wird von innen her durch einen Dichtungsring (5) fixiert und gegen das sich innen befindliche Gestein geschützt. Ein zusammengebauter Probenbehälter (7) kann dann beidseitig mit den Schläuchen des restlichen Durchfluss-Systems verbunden werden.

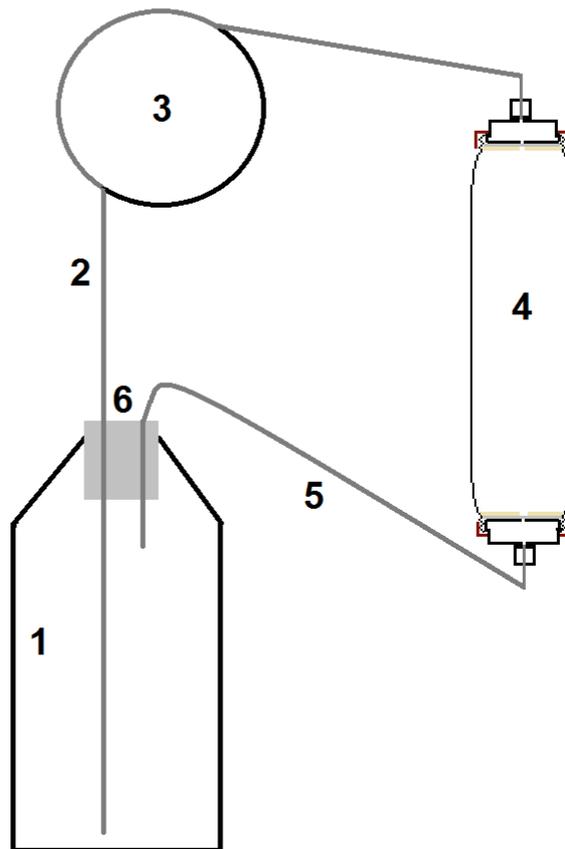


Abb.6: Schema des verwendeten Durchfluss-System zur Untersuchung von Gesteinsverwitterung. Aus einem Mediengefäß (1) wird über einen abführenden Schlauch (2) Medium durch eine Peristaltikpumpe (3) von oben in den Probenbehälter (4) geführt, welcher mit granuliertem Gestein gefüllt ist und vergleichend mit und ohne Zugabe von Mikroorganismen inkubiert wird. Durch einen abführenden Schlauch (5) gelangt sterilfiltriertes Medium in das Mediengefäß. Es liegt ein geschlossener Kreislauf vor, welcher eine Anreicherung von aus dem sich im Probenbehälter befindlichen Gestein gelösten Elementen erlaubt. Das Mediengefäß ist mit einem Gummistopfen (6) verschlossen, welcher nur zwei Öffnungen für die hindurchtretenden Schläuche besitzt. Der Durchtritt erfolgt jeweils über kurze Glasstücke, die dem Druck des Gummistopfens standhalten und gleichzeitig eine Abdichtung nach außen erleichtern. Im Experiment wurden 7 Probengefäße und dem entsprechend auch 7 Mediengefäße parallel verwendet.

Es wurden sieben parallele Glassäulen für die Experimente zur Verwitterung des Granits verwendet:

1. Drei Säulen wurden mit Mischkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* angeimpft und mit dem Verwitterungsmedium 1 (siehe 2.1.3.2) durchflossen.
2. Drei Säulen wurden nur mit dem Verwitterungsmedium 1 durchflossen und dienten als abiotische Kontrolle.
3. Eine Säule wurde mit Millipore-Wasser durchflossen und diente als separate abiotische Kontrolle.

Für die zusätzlichen Experimente zur Verwitterung von Mikroklin und Albit wurde jeweils eine Säule mit den Mischkulturen angeimpft und eine diente als abiotische Kontrolle. Alle dieser Säulen wurden mit dem Verwitterungsmedium 1 durchflossen. Eine photographische Aufnahme der Durchfluss-Apparatur ist in Abb.7 zu sehen.

### **Vorbereitung des Inokulums**

Die Vorbereitung des Inokulums erfolgte prinzipiell, wie in 2.2.1 beschrieben, allerdings wurden die Waschlösung und das finale Inokulumsmedium modifiziert. Das Verwitterungsmedium 1 diente für beide Biofilmpartner sowohl als Waschlösung als auch als finales Inokulumsmedium. Die abgeschätzten Startzellzahlen betragen jeweils  $7 \cdot 10^7$  für *K. petricola* und *N. punctiforme*. Das Inokulum wurde unter einer Sicherheitswerkbank unter aseptischen Bedingungen in die obere Öffnung der Probenbehälter pipettiert.

### **Quantifizierung des Wachstums**

Die Quantifizierung des Wachstums wurde für diese Experimente über eine Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.2.1) für *K. petricola* und über eine Bestimmung des Chlorophyll a Gehalts (siehe 2.2.1) für *N. punctiforme* durchgeführt, für beide Organismen erfolgte parallel dazu eine Zellzahlquantifizierung durch qPCR (2.2.1). Dazu wurde jeweils 1 g Gestein für jede Analyse verwendet, Gesteinskörner wurden von drei verschiedenen Positionen aus der Säule entnommen, mittig und an den beiden Säulenenden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie im jeweiligen Teil in 2.2.1 beschrieben.

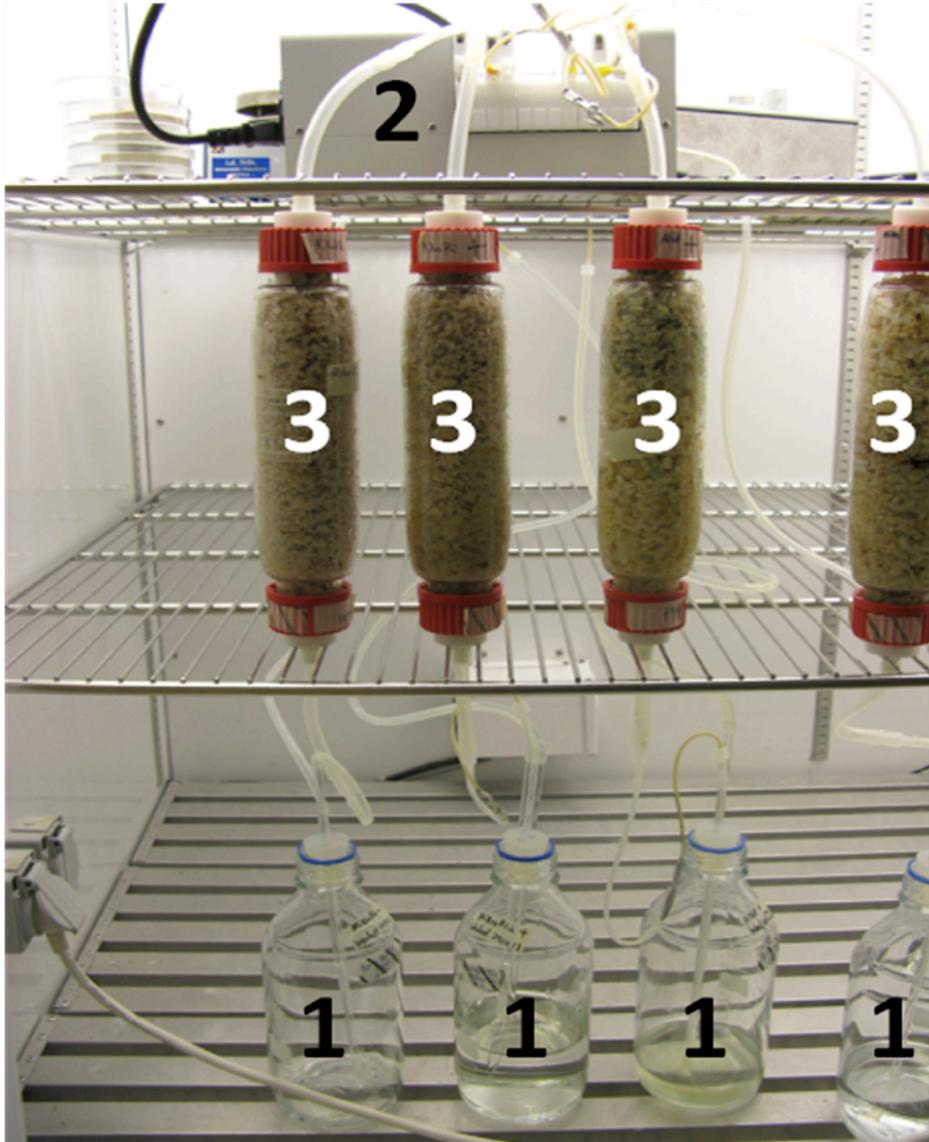


Abb.7: Photographische Aufnahme des Durchfluss-Systems. Aus Mediengefäßen (1) wird Medium über abführende Schläuche durch eine Peristaltikpumpe (2) von oben in die Probenbehälter (3) gepumpt und verlässt diese wieder an den unteren Enden durch Schläuche in die Mediengefäße (1). Die Probenbehälter sind mit Gesteinsgranulat der Korngröße 1-6 mm befüllt. Für das Experiment mit Granitmaterial wurden 7 Säulen laufen gelassen (3X biotisch, 3X abiotisch, 1X Millipore-Wasser); für das in der Photographie gezeigte Experiment mit Albit und Mikroklin wurden 4 Säulen verwendet (je 1X biotisch und abiotisch).

### **Analyse der Säuleneluat**

Aus den Säulen wurden für die Granitexperimente nach 45 d, 90 d und 180 d unter aseptischen Bedingungen Eluatproben genommen, für die Mikroklin- und Albitexperimente nur nach 45 d und 180 d. Nach Abnahme von jeweils 50 ml Eluatvolumen wurde ein entsprechendes Volumen an frischem, sterilem Medium in die Säulen gegeben.

Die Eluatproben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Eine Messung der Elemente Aluminium (Al), Barium (Ba), Calcium (Ca), Cobalt (Co), Kupfer (Cu), Eisen (Fe), Kalium (K), Magnesium (Mg), Mangan (Mn), Natrium (Na) und Zink (Zn) erfolgte per ICP-MS bzw. ICP-OES in der Fachgruppe 4.3; dabei wurde ein ICP-OES-Gerät des Typs iCAP 7400 Duo (Thermo Scientific) und ein ICP-MS iCAP-Q Gerät (Thermo Scientific) verwendet. Für die Messung wurden die Proben mit 65%iger HNO<sub>3</sub> auf 5 mM HNO<sub>3</sub> angesäuert.

Zusätzlich wurde der pH-Wert in der Flüssigphase der Proben vor und nach dem Experiment gemessen.

### **Analyse der Gesteinskörner/-stücke**

Die Gesteinskörner bzw. -stücke wurden licht- und elektronenmikroskopisch dokumentiert. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte photographisch, die elektronenmikroskopische zusätzlich mineralogisch/chemisch durch EDS -Messungen.

REM-Aufnahmen wurden an einem ESEM-Mikroskop XL30 (Fei, Hillsboro, OR, USA) zusammen mit Frau Feldmann durchgeführt. Biotische Proben wurden dazu mit 4% Glutaraldehyd (Merck) für 2 h fixiert, 3 Mal für 15 Minuten in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7) gewaschen und anschließend wie im folgenden Schema über eine Ethanolreihe dehydriert:

1. 30 Minuten in 30% Ethanol
2. 30 Minuten in 50% Ethanol
3. 30 Minuten in 70% Ethanol
4. 60 Minuten in 80% Ethanol
5. 60 Minuten in 90% Ethanol
6. 2 Mal 30 Minuten in 100% Ethanol

Es folgte eine Kritische-Punkt-Trocknung und eine anschließende Goldbedampfung der Proben im Bereich 4.2 der BAM durch Frau Feldmann. Abiotische Proben konnten direkt bedampft werden. Diese Untersuchungen dienten in erster Linie der Untersuchung der biologischen Strukturen auf den Gesteinen und nur sekundär deren Einfluss auf das Material.

Um das Gestein auf mögliche Veränderungen hin analysieren zu können, wurden Dünnschliffe von Gesteinsstücken bzw. Anschliffe von Gesteinskörnern mit deren

Grenzflächen zur Luft bzw. zu biologischen Strukturen hergestellt, wobei eine Einbettung in Epoxidharz stattfand. Dünnschliffe wurden an der FU Berlin im Arbeitsbereich Mineralogie-Petrologie hergestellt und in Kooperation mit Dr. Ralf Milke per Mikrosonde (JEOL JXA 8200) durch EDS analysiert. Anschliffe von Gesteinskörnern mit Grenzflächen zu biologischen Strukturen bzw. zur Luft wurden am Helmholtz-Zentrum Berlin durch Herrn Schubert-Bischoff präpariert und per TEM-EDS (CM12, Philips, Amsterdam, Niederlande) analysiert. Angeschliffene Gesteinskörner wurden zudem durch EDS-Analysen per REM im Bereich 4.2 der BAM durch Frau Feldmann durchgeführt. Die Probenanregung für REM-EDS-Analysen (einschließlich Mikrosondenanalysen) wurde mit 15 kV Beschleunigungsspannung und einem 5 µm breiten Elektronenstrahl für 10 s durchgeführt, TEM-EDS-Analysen mit 120 kV für 300 s.

Zur Berechnung der Verwitterungsindices WIP und CIA wurden Gesteinskörner des Ausgangszustandes und der unterschiedlichen biotischen (3fach) und abiotischen (3fach mit Medium, 1fach mit Millipore-Wasser) Proben aufgeschlossen und per ICP-MS bzw. ICP-OES wie für die Eluate beschrieben analysiert. Der Aufschluss erfolgte, indem 0,2 g Gesteinspulver mit einer Säuremischung (4 ml 65%ige HNO<sub>3</sub>, 2,5 ml 32%ige HCl und 1 ml 48%ige HF) für 1 h in der Mikrowelle bei einer maximalen Temperatur von 210°C inkubiert wurden. Zur Komplexierung schwer löslicher Fluoride wurden 10 ml kalt gesättigte Borsäure hinzugegeben. Die Berechnung der Indices erfolgte nach [200], den Gleichungen (3) und (4) entsprechend (beschrieben in 1.1.1).

### **2.2.5.2 Verwitterung einzelner Minerale**

In einem weiteren Verwitterungsexperiment wurden die in 2.1.1.3 aufgeführten Minerale in Batch-Kulturen unter Standardbedingungen (2.2.1) für einen Zeitraum von 60 d inkubiert. Es wurden pro Ansatz 4 g Mineral mit 10 ml Nährlösung inkubiert. Um potentielle chemische Kontaminationen in Mineralen, Nährlösungen und Materialien möglichst weit zu minimieren, wurden in diesem Experiment nicht nur gegenüber Granit mineralogisch weniger komplexe Minerale verwendet sondern auch Inkubations- und Nährlösungsgefäße aus anderem Material.

#### **Vorbereitung der Minerale**

Die Minerale wurden per Vibrationsmühle des Typs Pulverisette (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) mit anschließendem Sieben auf eine Korngröße von <200 µm gebracht. Calcit und Olivin konnten sofort gemahlen und gesiebt werden, Forsterit wurde vorher aus

Magnesiumoxid und Siliziumoxid im Schmelzofen hergestellt, indem die entsprechenden Edukte gemäß der Stöchiometrie in Reaktionsgleichung (5) eingewogen und gut miteinander vermischt wurden.



Es folgten 2 d Inkubation bei 1450°C, 1 d Inkubation bei 1500°C und 3 d Inkubation bei 1550°C; die Inkubationen fanden jeweils im Schmelzofen statt, das Gemisch wurde zwischen den Inkubationsschritten in einem Mörser zerkleinert und erneut gemischt. Ein Aliquot des gemörserten Pulvers wurde nach den Inkubationsschritten 2 und 3 per Röntgendiffraktometrie mit einem Doppel-Pulverdiffraktometer PDF-2 (FU Berlin, Mineralogie) auf den Gehalt an Forsterit hin getestet. Nach Inkubationsschritt 3 bestand das Pulver zu 97% aus Forsterit und konnte für die Verwitterungsversuche eingesetzt werden; da der so hergestellte Forsterit mikrokristallin war, führte das Mörsern automatisch zu Korngrößen von <200 µm. Die Oberfläche der Minerale wurde per BET-Messung nach DIN-ISO 9277 entsprechend der in [201] beschriebenen Theorie mit einem TriStar II 3020 (Micromeritics GmbH, Aachen) bestimmt.

### **Vorbereitung der Gefäße und der Nährlösung**

Die Inkubationsgefäße waren durch Gammastrahlung sterilisierte Zellkulturflaschen (Orange Scientific) aus Polystyren; sie wurden vor dem Gebrauch für die Experimente einer Reinigungsprozedur unterzogen. Steriles Millipore-Wasser zum Spülen zwischen den einzelnen Reinigungsschritten und am Ende der Reinigungsprozedur wurde in sterilen Polypropylenbehältern (Nalgene™) gelagert, welche selbst vorher 5fach mit Millipore-Wasser gespült worden waren. Die Reinigungsprozedur verlief folgendermaßen:

1. Die Behälter wurden mit 5 ml 100% Ethanol gefüllt und über Nacht bei 100 rpm schütteln gelassen.
2. Nach der Entnahme des Ethanols erfolgten 5 Waschschrte mit jeweils 5 ml Millipore-Wasser; die Behälter wurden per Hand geschüttelt und dann das Wasser entnommen.
3. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 3 d mit 5 ml 1 M HCl bei 100 rpm. Zur Herstellung von 1M HCl wurde 37%ige HCl mit sterilem Millipore-Wasser in sterilen Polypropylenbehältern (Nalgene™) entsprechend verdünnt.
4. Nach der Entnahme der HCl erfolgten erneut 5 Waschschrte mit Millipore-Wasser.

5. Nun wurde über 3 d mit 5 ml 1 M HNO<sub>3</sub> bei 100 rpm inkubiert. Zur Herstellung von 1M HNO<sub>3</sub> wurde 65%ige HNO<sub>3</sub> mit sterilem Millipore-Wasser in sterilen Polypropylenbehältern (Nalgene™) entsprechend verdünnt.
6. Nach der Entnahme der HNO<sub>3</sub> wurde 5fach mit Millipore-Wasser gewaschen.
7. Es erfolgte eine Trocknung der Behälter unter einer Sicherheitswerkbank für wenigstens 3 d.

Alle Schritte, die mit einer Öffnung der Inkubations- oder Waschgefäße verbunden waren, wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Als Nährlösung diente das Verwitterungsmedium 2 (2.1.3.2); es wurde in entsprechend der oben beschriebenen Reinigungsprozedur gereinigten Polypropylenbehältern angesetzt.

Es wurden 60 Zellkulturflaschen für die Experimente zur Verwitterung einzelner Minerale entsprechend Tab.7 angesetzt: Für jedes Mineral wurden biotische Tests mit Einzel- und Mischkulturen sowie abiotische Tests mit Verwitterungsmedium 2 und Millipore-Wasser als Triplikate durchgeführt; als zusätzliche Kontrolle dienten jeweilige biotische und abiotische Ansätze ohne Mineral.

Tab.7: Schema für die Experimente zur Verwitterung der Minerale Calcit, Forsterit und Olivin; sämtliche Proben wurden mit einer Korngröße von <200 µm angesetzt.

Medium/Mineral	Calcit	Forsterit	Olivin	Ohne Mineral
+ <i>N. punctiforme</i> -Einzelkultur	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze
+ <i>K. petricola</i> -Einzelkultur	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze
+ Mischkultur	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze
nur Verwitterungsmedium	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze
nur Millipore-Wasser	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze	3 Ansätze

### Vorbereitung des Inokulums

Die Vorbereitung des Inokulums erfolgte prinzipiell, wie in 2.2.1 beschrieben, allerdings wurden die Waschlösung und das finale Inokulumsmedium modifiziert. Das Verwitterungsmedium 2 diente für beide Biofilmpartner sowohl als Waschlösung als auch als finales Inokulumsmedium. Die abgeschätzten Startzellzahlen betragen jeweils  $1 \cdot 10^6$  für *K.*

*petricola* und *N. punctiforme*. Das Inokulum wurde unter einer Sicherheitswerkbank unter aseptischen Bedingungen in die Öffnung der Probenbehälter pipettiert.

### **Quantifizierung des Wachstums**

Die Quantifizierung des Wachstums erfolgte durch qPCRs. Dazu wurde jeweils 1 g Gestein für jede Analyse verwendet, die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben.

### **Analyse der Flüssigphase nach deren Abtrennung von der Festphase**

Die Flüssigphase wurde in Falcon Röhrchen transferiert und für 15 Minuten bei 7800 rpm zentrifugiert, um Mikroorganismen und restliche Festphasenbestandteile von der Flüssigphase trennen zu können. 5 ml des Überstands wurden in neue Falcon Röhrchen überführt. Diese Flüssigphasenproben wurden bis zur Messung über ICP-OES bei -20°C gelagert. Zusätzlich wurde der pH-Wert in den Flüssigphasen der Proben vor und nach dem Experiment gemessen.

Die ICP-OES Messungen wurden am GFZ (Sektion 3.4) an einer axialen ICP-OES 720ES (Varian, Palo Alto, CA, USA) durchgeführt. Verwendete Kalibrierungsstandards wurden aus der Multielement Lösung Merck ICP Multi Element Standard Solution IV CertiPUR plus Titanium Merck CertiPUR (Merck) hergestellt. Die Proben wurden dazu 1:100 verdünnt und mit HNO<sub>3</sub> vom GFZ (Sektion 3.4), welche bzgl. der Reinheit ICP-OES-Ansprüchen genügt, auf eine Konzentration von 0,3 M HNO<sub>3</sub> angesäuert. Die Messungen erfolgten gegen das verwendete Verwitterungsmedium 2 (2.1.3.2) - angesäuert auf 0,3 M mit HNO<sub>3</sub> des GFZ (Sektion 3.4) - als Blank, die Konzentrationen konnten aus den bekannten Konzentrationen der Kalibrierungsstandards berechnet werden. Es wurden 10 ml jeder Probe für die Messungen verwendet, welche mit einer Präzisionswaage (Sartorius) gewogen wurden; jede Probe wurde 3fach gemessen.

Standardmäßig wurden die Elemente Al, Ar, B, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Si, Sr, Ti und Zn gemessen. Um als detektierbar bzw. quantifizierbar zu gelten, musste die Konzentration eines entsprechenden Elements in einer Probe die Konzentration des gleichen Elements innerhalb des Blanks um *per definitionem* festgelegte Verhältnisse übersteigen. Das Detektionslimit wurde als der Mittelwert des entsprechenden Elements innerhalb der Blank-Proben mit deren dreifacher Standardabweichung hinzuaddiert definiert, das Quantifizierungslimit als der Mittelwert mit der zehnfachen Standardabweichung hinzuaddiert.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Wachstum des Modellbiofilms auf Nährmedium

##### Wachstum des Modellbiofilms als Einzelkultur, mit Sterilfiltrat und als Mischkultur

Beim Vergleich des Wachstums der jeweiligen Einzelkulturen mit dem Wachstum in Mischkulturen oder in Anwesenheit von Sterilfiltrat der jeweils anderen Einzelkultur konnte ein verstärktes Wachstum für beide Biofilmpartner in den Mischkulturen beobachtet werden (Abb.8, 9). Der verstärkende Effekt war für Kulturen von *N. punctiforme* deutlich größer.

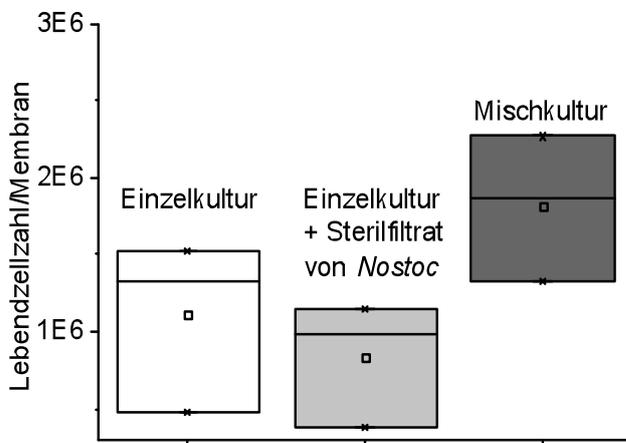


Abb.8: Vergleich der Lebendzellzahlen auf Membranen auf BG11-Platten (pH 6) zwischen Einzelkulturen von *K. petricola* mit denen innerhalb von Mischkulturen mit *N. punctiforme* bzw. mit Einzelkulturen in Anwesenheit von Sterilfiltrat von *N. punctiforme* nach 22 d Inkubation unter Standardbedingungen (2.2.1) mit n=3.

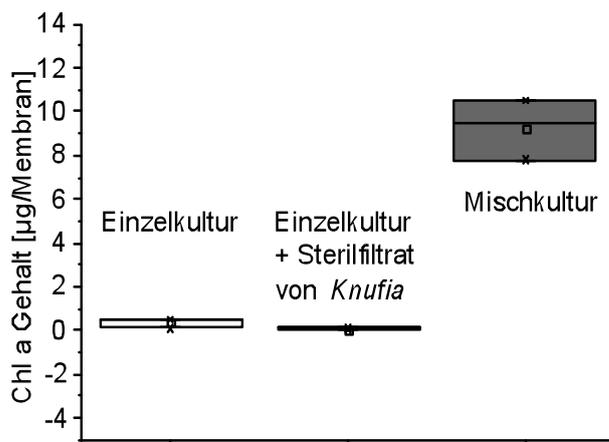


Abb.9: Vergleich der Chlorophyll a Gehalte auf Membranen auf BG11-Platten (pH 6) zwischen Einzelkulturen von *N. punctiforme* mit denen innerhalb von Mischkulturen mit *K. petricola* bzw. mit Einzelkulturen in Anwesenheit von Sterilfiltrat von *K. petricola* nach 22 d Inkubation unter Standardbedingungen (2.2.1) mit n=3.

Zwischen den Einzelkulturen ohne und mit Sterilfiltrat der jeweils anderen Einzelkultur war kein Unterschied zu sehen (Abb.8, 9). Die gleichen Effekte konnten auch bzgl. der Biomassen zwischen Einzel- und Mischkulturen bzw. Einzelkulturen mit und ohne Zugabe von Sterilfiltraten beobachtet werden.

Es ist also davon auszugehen, dass die Anwesenheit des jeweils anderen Biofilmpartners sowohl für *K. petricola* als auch für *N. punctiforme* zu einem verstärkten Wachstum führt. Der positive Effekt ist dabei nicht auf die in einer jeweiligen Einzelkultur abgegebenen Metabolite des Biofilmantagonisten zurückzuführen, denn in diesem Fall müsste die Präsenz einer solchen sterilfiltrierten Suspension, in der keine Zellen aber Metabolite vorhanden sind, das Wachstum des anderen Biofilmpartners ebenfalls positiv beeinflussen. Der Grund des verstärkten Wachstums in Mischkulturen lässt sich durch diese Experimente daher nicht eruieren.

Die gegenseitig verstärkende Wirkung auf Wachstum kann auch dadurch zustande kommen, dass durch das Zusammenspiel von den mechanisch sehr stabilen *K. petricola*-Mikrokolonien und den größere Bereiche erfassenden *N. punctiforme*-Zellen der gesamte Biofilm stabilisiert wird. Eine Anordnung der Zellen beider Biofilmpartner innerhalb komplexer 3-dimensionaler Strukturen konnte in Labor-Biofilmen beider Organismen bereits gezeigt werden [148].

Dass kein positiver Effekt von sterilfiltrierten Einzelkulturlösungen auf das Wachstum des jeweiligen Biofilmantagonisten ausgeht, heißt nicht automatisch, dass in Mischkulturen ausgetauschte Metabolite keinen solchen Effekt haben können. Die Zusammensetzung der Metabolite eines Organismus kann sich in einer Mischkultur von der in einer Einzelkultur unterscheiden. So wird in Symbiosen zwischen dem Stickstoff fixierenden Bakterium *Sinorhizobium meliloti* und dem Hülsenfrüchtler *Medicago truncatula* die pflanzliche Oxylipidsynthese unterdrückt, was aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften für eine Symbiose auch nötig ist [202]. Cyanobakterien zeigen z.B. in Symbiosen eine 4-5fach erhöhte Heterozystenfrequenz verglichen mit jeweiligen Einzelkulturen und eine damit verbundene stärkere Stickstofffixierung, was Einfluss auf die Zusammensetzung der Metabolite haben kann [172, 203]. Ebenso die Bildung von Hormogonien kann von Symbiosepartnern abhängen [176, 177] und da für Hormogonien eine differentielle Transkription von über 1800 Genen gezeigt werden konnte [204], kann man davon ausgehen, dass sich in solchen Fällen die Zusammensetzung der Metabolite eines Organismus in An- und Abwesenheit von Symbiosepartnern unterscheidet. Setzt man nun also die steril filtrierte Einzelkultur eines Biofilmpartners der Einzelkultur des jeweils anderen Partners zu, ist es durchaus möglich, dass sich die Zusammensetzung dieser Mischung sehr

stark von einer Mischkultur mit beiden Biofilmpartnern unterscheidet. Im hier durchgeführten Experiment ist natürlich auch ein Dosis-Effekt nicht auszuschließen, da zu den Einzelkulturen von *N. punctiforme* und *K. petricola* nur 10% Volumen eines Sterilfiltrats der jeweils anderen Kultur in das Nährmedium gemischt wurden, während in der richtigen Mischkultur die Metabolite des anderen Biofilmpartners in direkter Umgebung und zudem auch fortwährend abgegeben werden konnten.

Der zeitliche Verlauf des Wachstums von Einzel- und Mischkulturen kann Aufschluss über mögliche Mechanismen geben und wird im Folgenden diskutiert.

### **Wachstumskurven des Modellbiofilms auf BG11/BG11<sub>0</sub> Festmedium**

Wachstumskurven auf BG11 und BG11<sub>0</sub> Festmedien zeigten deutliche Unterschiede zwischen Einzel- und Mischkulturen von *N. punctiforme* (Abb. 10, 11). Die finalen Chlorophyll a Gehalte waren generell höher für das Wachstum auf BG11 gegenüber BG11<sub>0</sub> sowie für das Wachstum in Mischkultur gegenüber dem in Einzelkultur. Die Generationszeiten von *N. punctiforme* lagen für das BG11 Festmedium bei 27 h für die Einzel- und 21 h für die Mischkulturen, für das BG11<sub>0</sub> Festmedium bei 29 h für die Einzel- und 23 h für die Mischkulturen. Die geringen Unterschiede in den berechneten Generationszeiten sind nicht signifikant, allerdings ist in beiden hiesigen Wachstumskurven zu erkennen, dass sich die Wachstumskinetik völlig unterschiedlich zwischen Einzel- und Mischkulturen verhält. Die exponentielle Phase erfolgt in den Mischkulturen deutlich früher ebenso wie das Einsetzen der Stationärphase.

Es erscheint daher so, dass das exponentielle Wachstum in Einzelkulturen gegenüber Mischkulturen nach hinten verschoben ist, was mit einer verlängerten Lag-Phase erklärbar wäre. Eine Verkürzung der Lag-Phase in Mischkulturen konnte für das chemolithoautotrophe Bakterium *Nitrosomonas europaea* gezeigt werden, Einzelkulturen verbleiben hier länger in der Lag-Phase [205]. Der Effekt wurde in diesem Fall auf den Austausch von Metaboliten mit anderen Organismen zurückgeführt und auch nach der Zugabe von Pyruvat an Einzelkulturen beobachtet.

Die Lag-Phase beschreibt den Zustand einer Kultur, in der sich die darin befindlichen Zellen im Übergang vom Startzustand zur Phase exponentiellen Wachstums befinden und sich an die Umgebung anpassen. Das hier sehr langsam auftretende Wachstum ist auf verschiedene Gründe zurückzuführen. Der Startzustand der Zellen in einem Inokulum kann sich bzgl. der Vitalität und Aktivität sehr stark unterscheiden. Stoffwechselreaktionen können z.B. nicht ablaufen, wenn die entsprechenden Enzyme sich in einem inaktiven Zustand befinden oder

notwendige Metabolite fehlen, die von den Zellen selbst während des Wachstums auf einem bestimmten Substrat hergestellt werden müssen [206].

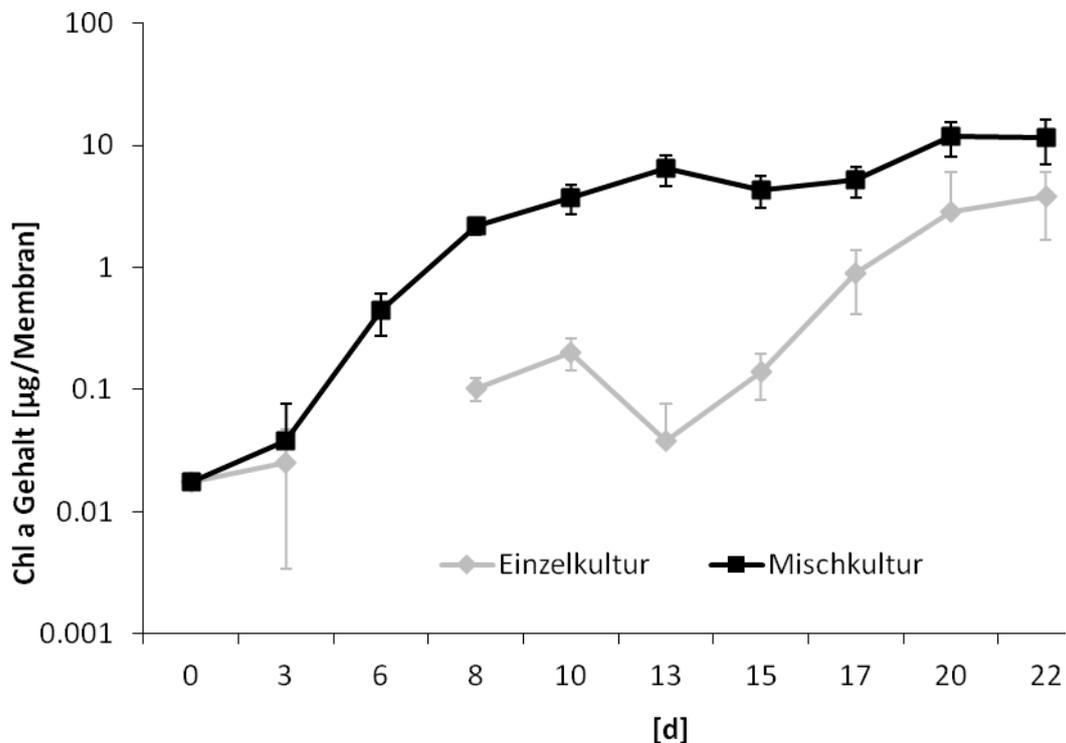


Abb.10: Wachstumskurven von *N. punctiforme* auf Membranen auf BG11 Festmedium (pH 6) als Einzelkultur und als Mischkultur mit *K. petricola*. Es wurden die Chl a Gehalte der auf den Membranen vorkommenden *N. punctiforme*-Zellen in 90% Methanol gemessen (n=3).

Die Anpassung an neue Wachstumsbedingungen kann daher die Um- oder Wiederherstellung bestimmter Enzymsysteme erfordern. Das Mischen von Organismen mit teilweise unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen in einem Inokulum kann die Anpassung an die neuen Wachstumsbedingungen beschleunigen, wenn z.B. eine größere Variabilität an Metaboliten und aktiven Enzymen vorliegt. Das Verschieben der exponentiellen Phase nach vorn ließe sich auf diese Weise für die *N. punctiforme*-Zellen in den Mischkulturen erklären. Dass dann ein solcher Effekt verstärkten Wachstums bei Zugabe von 10 Vol.% Sterilfiltrat von *K. petricola* in das Festmedium nicht zu erkennen ist, könnte Gründe der Konzentration haben, wenn sich in diesem Fall weniger solcher Metabolite in unmittelbarer Umgebung des Inokulums befinden. Eine alternative Erklärung wäre, dass für *N. punctiforme* nützliche Metabolite von *K. petricola* in Zell-gebundener Form vorliegen und durch die Sterilfiltration mit den Zellen entfernt wurden; bei Anwesenheit der *K. petricola*-Zellen hingegen wären sie weiterhin vorhanden und könnten bei entsprechender Nähe zu *N. punctiforme*-Zellen diesen verfügbar gemacht werden oder im Fall von Enzymen für Reaktionen von *N. punctiforme* verwendet werden.

Die Wachstumskurven von *K. petricola* zeigten keine Unterschiede zwischen Einzel- und Mischkulturen, obwohl in den einfachen Wachstumsversuchen ein Unterschied der finalen Zellzahlen beobachtet wurde (Abb.8). Der Unterschied zwischen Einzel- und Mischkulturen war allerdings wesentlich weniger deutlich als für *N. punctiforme* (Abb.9). Durch die Verwendung von Membranstücken geringerer Größe in den Wachstumskurven kann es daher auch sein, dass durch die dadurch generell niedrigeren Zellzahlen der schwach positive Effekt der Mischkultur auf das Wachstum von *K. petricola* nicht mehr zu erkennen ist. Die finalen Wachstumszustände der Wachstumskurven zeigten allerdings wie bei den *N. punctiforme*-Experimenten etwas niedrigere Werte für die Versuche auf BG11<sub>0</sub> Festmedium gegenüber BG11 Festmedium.

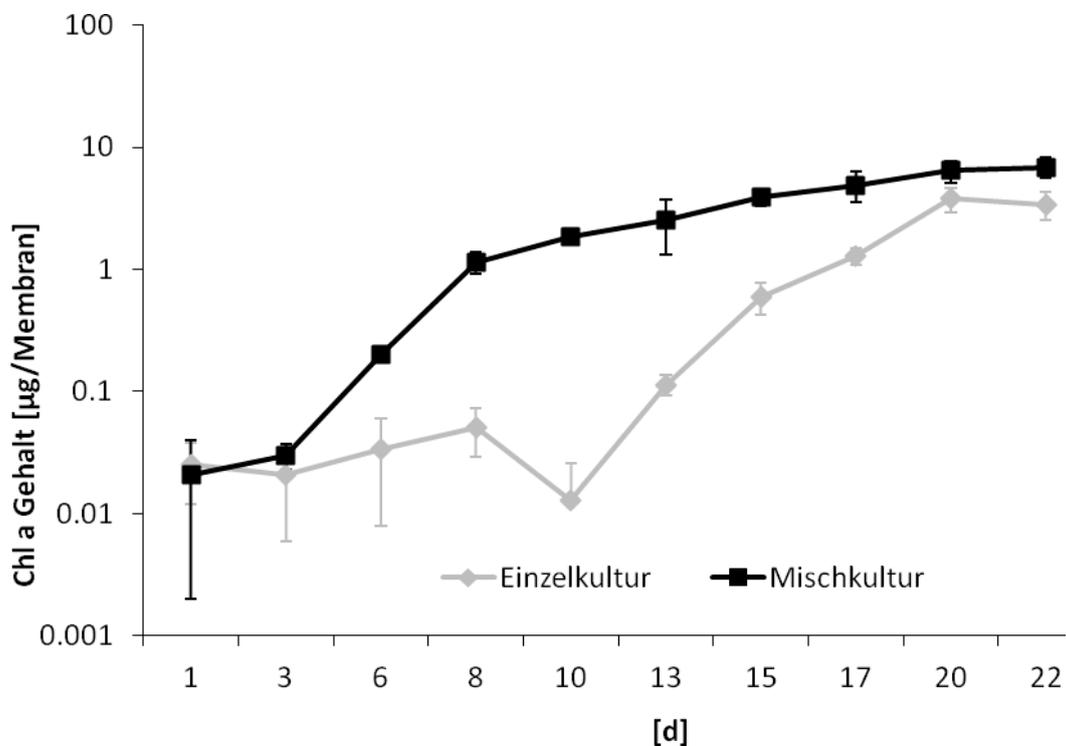


Abb.11: Wachstumskurven von *N. punctiforme* auf Membranen auf BG11<sub>0</sub> Festmedium (pH 6) als Einzelkultur und als Mischkultur mit *K. petricola*. Es wurden die Chl a Gehalte der auf den Membranen vorkommenden *N. punctiforme*-Zellen in 90% Methanol gemessen (n=3).

Die niedrigeren Wachstumswerte auf BG11<sub>0</sub> sind aufgrund der hier fehlenden Stickstoffquelle verständlich. Für *N. punctiforme* ist bekannt, dass bei Mangel an gebundenem Stickstoff ein langsames Wachstum mit verändertem Exo-Metabolom und Exo-Proteom stattfindet [207]. Dass es sich bei *K. petricola* ähnlich verhält, war aufgrund dessen Abhängigkeit von bereitgestelltem Stickstoff durch *N. punctiforme* zu erwarten.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in Mischkulturen zwischen *K. petricola* und *N. punctiforme* das Wachstum beider Organismen gegenüber Einzelkulturen verstärkt wird. Dieser Effekt tritt deutlicher bei *N. punctiforme* auf und schlägt sich hier auch in einer veränderten Wachstumskinetik nieder.

### **3.2 Gesteinsbewuchs unter variierenden Witterungsbedingungen**

Die vergleichende Wachstumsanalyse der Mischkulturen von *K. petricola* und *N. punctiforme* unter variierenden Witterungsbedingungen ergab deutliche Unterschiede im Wachstum in Abhängigkeit von Temperatur, Gesteinstyp und Kultivierungsbedingung. Die Unterschiede zeigten sich für beide Biofilmpartner in unterschiedlicher Art.

#### **Wachstum in Schüttelkulturen**

*K. petricola* wuchs in Schüttelkulturen (Methodik beschrieben in 2.2.3.1) unter Standardbedingungen bei 25°C auf allen verwendeten Gesteinen tendenziell besser als bei 15°C (Abb.12); in Anbetracht der Fehlerbalken sind die Unterschiede für Marmor nicht signifikant. Lebendzellzahlunterschiede zwischen den Ansätzen auf verschiedenen Gesteinen konnten bei 15°C beobachtet werden, bei 25°C zeigte sich nur für Marmor signifikant geringeres Wachstum (Abb.12). Bei einem Temperaturschock von 35°C für 3 d und anschließender Inkubation bei 25°C konnten auf keinem Gestein lebende Zellen von *K. petricola* nachgewiesen werden.

Temperaturprofile von *K. petricola* in Schüttelkulturen oder auf Festmedien unter der Verwendung von *Knufia*-spezifischen Nährmedien zeigen, dass ein Wachstum bei  $\leq 5^\circ\text{C}$  und bei  $\geq 35^\circ\text{C}$  nicht stattfindet, bei 30°C und 15°C hingegen schon; das Temperaturoptimum liegt bei 25°C [208]. Für mikrokoloniale Pilze ist bekannt, dass sie Temperaturen, die weit über der maximal für Wachstum tolerierbaren Temperatur liegen, bis zu 21 d lang überleben können [139]. Ändern sich die Bedingungen anschließend zu günstigeren Temperaturen hin, kann erneut Wachstum einsetzen. Bei *K. petricola* hingegen wirkt beim Wachstum auf Gesteinssubstraten ein Temperaturschock von 3 d bei 35°C offenbar bereits letal.

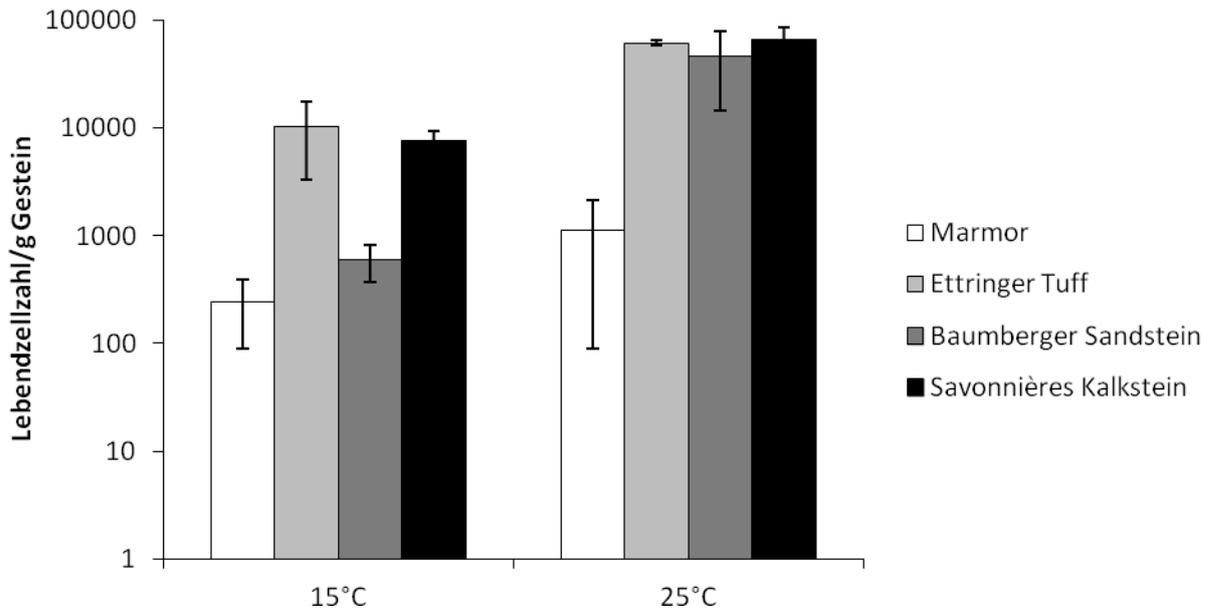


Abb.12: Finale Wachstumszustände von *K. petricola* auf verschiedenen Gesteinen bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen in schüttelnden Mischkulturen (Bedingungen in 2.2.3.1 beschrieben) mit *N. punctiforme* nach 22 d Inkubation. Es wurden die Lebendzellzahlen der auf den Gesteinen vorkommenden *K. petricola*-Zellen auf MEA-Platten analysiert (n=3).

Ein Wachstum bei 25°C fand auf den verwendeten Gesteinen, die sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften stark unterscheiden (Tab.1, 2, 2.1.1.1), in sehr ähnlichem Ausmaß statt; die abfallenden Werte für Marmor könnten auf dessen geringere Porosität im Vergleich zu den anderen Gesteinen zurückzuführen sein. Stärkeres Wachstum mit zunehmender Porosität wurde für Bewuchs durch Pilze und Phototrophe auf unterschiedlichen Kalksteinen gezeigt [209-211]. Das Wachstum findet in diesen Fällen oft auch endolithisch statt und die Mikroorganismen sind den äußeren Bedingungen nicht in der gleichen Form ausgesetzt wie an der Oberfläche. Geringeres Wachstum bei 15°C auf Marmor und Baumberger Sandstein gegenüber Ettringer Tuff und Savonnières Kalkstein könnte daher auch in der Porosität begründet liegen, die für die beiden zuletzt genannten Gesteine höher liegt (Tab.1, 2.1.1.1). Unter Temperaturbedingungen weit unter dem Optimum, wie sie bei 15°C vorliegen, müssen die Mikroorganismen zusätzlich zu anderen Stressbedingungen wie Lichtintensität und durch das Schütteln der Kolben verursachte Strömung mit Temperaturstress umgehen. Diesen Stressfaktoren kann durch endolithisches Wachstum teilweise ausgewichen werden, was mit zunehmender Porosität einfacher geschieht. Der Effekt geringeren Wachstums tritt bei Baumberger Sandstein nur bei 15°C, also bei Temperaturstress, auf (Abb.12). Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei 25°C generell ein stärkeres Wachstum stattfindet, unabhängig davon, ob die Zellen sich in Poren oder an der Oberfläche befinden, da es sich um das Temperaturoptimum von *K. petricola* handelt. Da sich in poröseren Gesteinen wie Ettringer Tuff oder Savonnières Kalkstein immer

mutmaßlich mehr Zellen in den Poren befinden als in den weniger porösen Gesteinen wie Baumberger Sandstein, äußert sich bei ersteren ein geringes Oberflächenwachstum, wie es bei Temperaturstress vorkommen kann, weniger in einer geringen Gesamtzellzahl als bei letzteren. Die generell niedrigen Zellzahlen auf Marmor könnten auch auf die dort glattere Oberfläche zurückzuführen sein. Während auf den anderen Gesteinen eine rauere Oberfläche das Anhaften eines Biofilms an diese erleichtern kann, werden sich an Marmor anhaftende Biofilme möglicherweise einfacher wieder weggespült. Es ist aus Biorezeptivitätsstudien von Gesteinen bekannt, dass die Oberflächenrauheit bei der Gesteinsbesiedlung eine entscheidende Rolle spielt [210].

*N. punctiforme* zeigte größere Unterschiede im Wachstum auf verschiedenen Gesteinen in den Schüttelkulturen und wuchs bei allen 3 verwendeten Temperaturbedingungen (Abb.13). Das eindeutig stärkste Wachstum fand für alle Temperaturen auf Savonnières Kalkstein statt, wo wie für Marmor bei 25°C gegenüber 35°C und 15°C höhere Chlorophyll a Gehalte gemessen wurden. Auf Baumberger Sandstein wurde keine eindeutige Temperaturabhängigkeit beobachtet, während auf Ettringer Tuff bei 25°C sogar die vergleichsweise niedrigsten Abundanzen gemessen wurden. *N. punctiforme* wuchs bei 15°C auf Marmor schlechter als auf Baumberger Sandstein und Ettringer Tuff, bei 25°C hingegen besser.

Mögliche Erklärungen sind wie für *K. petricola* eher spekulativer Natur. Für Savonnières Kalkstein und Marmor könnten die niedrigeren Werte bei 15°C und 35°C auf das dann verminderte Oberflächenwachstum zurückzuführen sein; der porösere Savonnières Kalkstein weist dann aufgrund von Wachstum in Poren trotzdem noch relativ hohe Abundanzen auf, während die Werte bei Marmor aufgrund des hier vorwiegenden Oberflächenwachstums unter Stressbedingungen stark abfallen. Die Abundanzen auf den anderen beiden Gesteinen zeigen diese Temperaturabhängigkeit jedoch nicht. Da sich Marmor und Savonnières Kalkstein bzgl. des hohen Calciumcarbonat-Anteils von  $\geq 98\%$  von den anderen Gesteinen unterscheiden (Tab.2, 2.1.1.1), könnte auch die chemische Zusammensetzung auf den Bewuchs und dessen Temperaturabhängigkeit einen Einfluss ausgeübt haben. Da das Wachstum von Mikroorganismen auf Gesteinen neben der Porosität, Rauigkeit und chemischen Zusammensetzung von zahlreichen weiteren Faktoren im Gestein und im Zusammenspiel innerhalb des Biofilms abhängt, lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten keine sichere Erklärung abgeben.

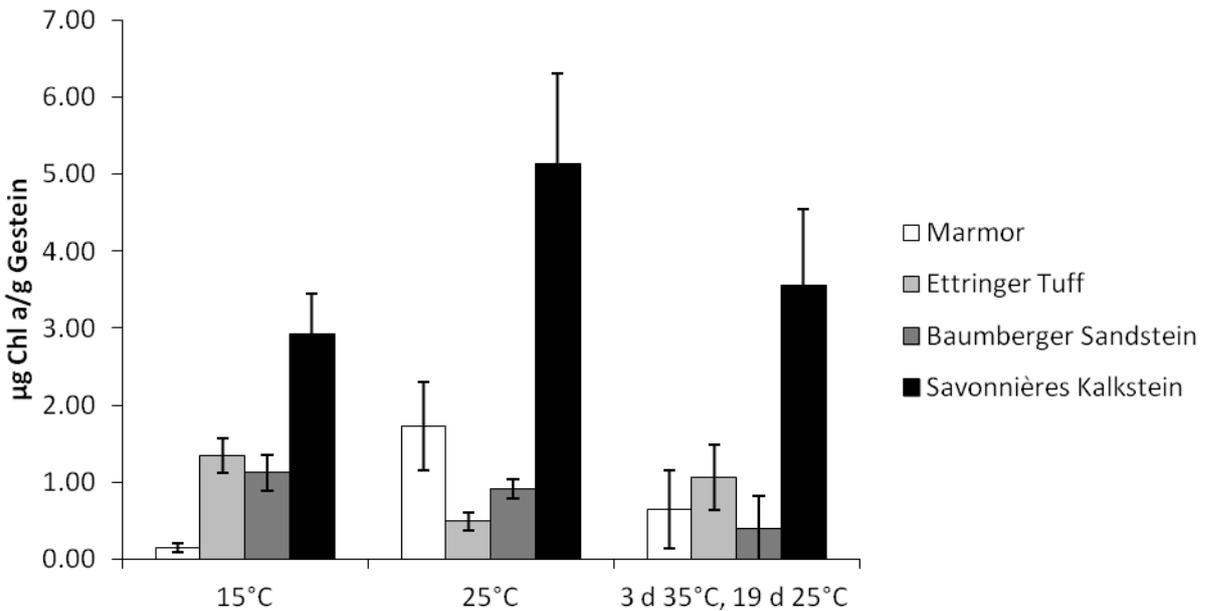


Abb.13: Finale Wachstumszustände von *N. punctiforme* auf verschiedenen Gesteinen bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen in schüttelnden Mischkulturen (Bedingungen in 2.2.3.1 beschrieben) mit *K. petricola* nach 22 d Inkubation. Es wurden die Chl a Gehalte der auf den Gesteinen vorkommenden *N. punctiforme*-Zellen in 90% Methanol gemessen (n=3).

Generell kann gesagt werden, dass *K. petricola* auf allen Gesteinen bei 25°C besser wächst als bei 15°C und dass das Wachstum auf Marmor am schwächsten ist. *N. punctiforme* hingegen wächst auf Savonnières Kalkstein am besten und zeigt für diesen und für Marmor einen temperaturabhängigen Bewuchs mit optimalen Werten bei 25°C.

Für den Einfluss der Porosität auf das Wachstum sprechen photographische Aufnahmen von Zellen des Biofilms auf Savonnières Kalkstein (Abb.14) und auf Marmor (Abb.15). Auf ersterem Gestein ist selbst bei niedriger Vergrößerung ein stark ausgeprägtes Wachstum innerhalb von Poren zu erkennen (Abb.14), bei Marmor hingegen auch bei sehr starker mikroskopischer Vergrößerung nur an der Oberfläche (Abb.15).

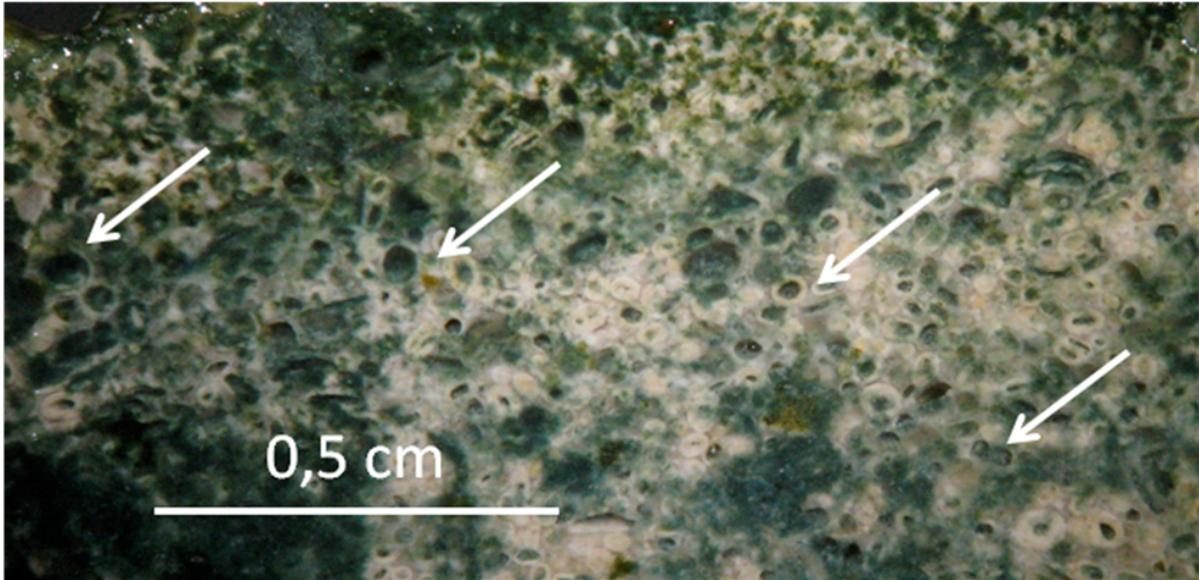


Abb.14: Photographische Aufnahme eines Savonnières Kalkstein-Blocks, der mit einem Biofilm aus *K. petricola* und *N. punctiforme* für etwa 3 Monate inkubiert wurde (Aufnahme unter dem Binokular). Man sieht schon bei relativ niedriger Vergrößerung zahlreiche Poren, in welchen das Wachstum des Biofilms (angezeigt durch die weißen Pfeile) unter anderem stattfindet.

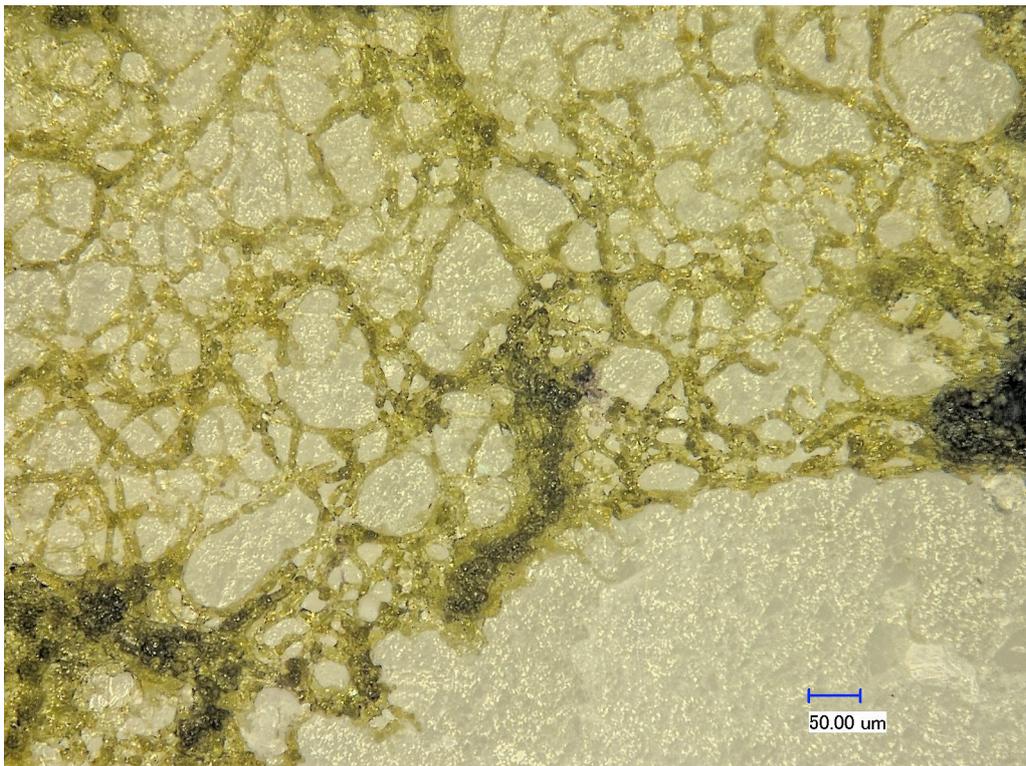


Abb.15: Photographische Aufnahme eines Marmor-Blocks, der mit einem Biofilm aus *K. petricola* und *N. punctiforme* für 4 Wochen inkubiert wurde (Aufnahme unter einem VHX-1000 Mikroskop (Keyence Corporation, Osaka, Japan)). Die Marmoroberfläche erscheint auch bei 250facher Vergrößerung noch relativ glatt und aufgrund fehlender Poren erfolgt das Wachstum des Biofilms hier nur an der Oberfläche.

## Wachstum unter diskontinuierlichen und semikontinuierlichen Bedingungen

Beim Vergleich des Wachstums in feuchten Kammern und in einem Durchfluss-System (Bedingungen beschrieben in 2.2.3.2) zeigten sich Unterschiede vor allem in der Struktur des Biofilms und weniger in der Abundanz von *K. petricola* und *N. punctiforme*. Die Lebendzellzahlen für *K. petricola* sind unter beiden verwendeten Kultivierungsbedingungen sehr ähnlich und beim Wachstum in BG11<sub>0</sub> Medium niedriger als in BG11 Medium (Abb. 16). Die gemessenen Chlorophyll a Gehalte zur Abschätzung des Wachstums von *N. punctiforme* zeigen leichte Unterschiede zwischen beiden Kultivierungsbedingungen mit höheren Werten für die Bedingungen der feuchten Kammer (Abb.17). Ein geringeres Wachstum auf BG11<sub>0</sub> Medium ist hier nur unter semikontinuierlichen Bedingungen erkennbar.

Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen äußern sich hauptsächlich in verschiedenen Luftfeuchten und der damit verbundenen Wasserverfügbarkeit für die Mikroorganismen im Biofilm. In der verwendeten semikontinuierlichen Kultur (2.2.3.2) liegt die Flüssigkeit der Nährlösung zu jeder Zeit während eines Experiments knapp unterhalb der Gesteinsoberfläche; diese ist durch die regelmäßige tropfenweise Zugabe von Nährlösung ständig benetzt und durch den hohen Flüssigkeitsstand sind die Poren eines porösen Gesteins immer nahe der Wassersättigung.

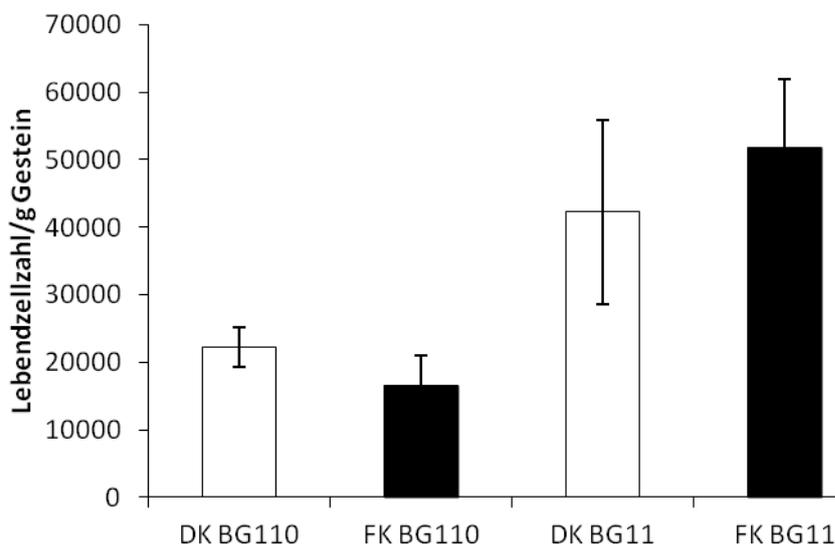


Abb.16: Finale Wachstumszustände von *K. petricola* auf Savonnières Kalkstein bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (in 2.2.3.2 beschrieben) in Mischkulturen mit *N. punctiforme* nach 4 Wochen Inkubation. Semikontinuierliche Kulturen erfolgten in Durchfluss-Kammern (DK), diskontinuierliche in feuchten Kammern (FK); die Kultivierung erfolgte in BG11<sub>0</sub> und in BG11 Medium. Es wurden die Lebendzellzahlen der auf den Gesteinen vorkommenden *K. petricola*-Zellen auf MEA-Platten analysiert (n=3).

In der feuchten Kammer erfolgt keine tropfenweise Zugabe von Lösung auf die Gesteinsoberfläche, sodass diese nicht ständig benetzt ist; da regelmäßig das unter dem Gestein liegende Filterpapier mit Flüssigkeit getränkt wird, kann letztere in Poren eines porösen Gesteins eindringen, durch Kapillareffekte bis an die Oberfläche vordringen und somit dem Biofilm zur Verfügung stehen.

Die Wasserverfügbarkeit für Mikroorganismen wird oft in der Wasseraktivität, dem Verhältnis des Dampfdrucks von Wasser im Substrat zu dem von reinem Wasser, ausgedrückt und die optimale Wasseraktivität kann sich deutlich zwischen verschiedenen Arten unterscheiden [212]. Differenzen im Wachstum zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen können daher auch auf die optimale Wasseraktivität der beteiligten Organismen zurückzuführen sein. Zumindest bzgl. der Abundanzen zeigen sich allerdings im Fall von *K. petricola* keine solchen Unterschiede (Abb.16), bei *N. punctiforme* sind sie teilweise zu erkennen (Abb.17).

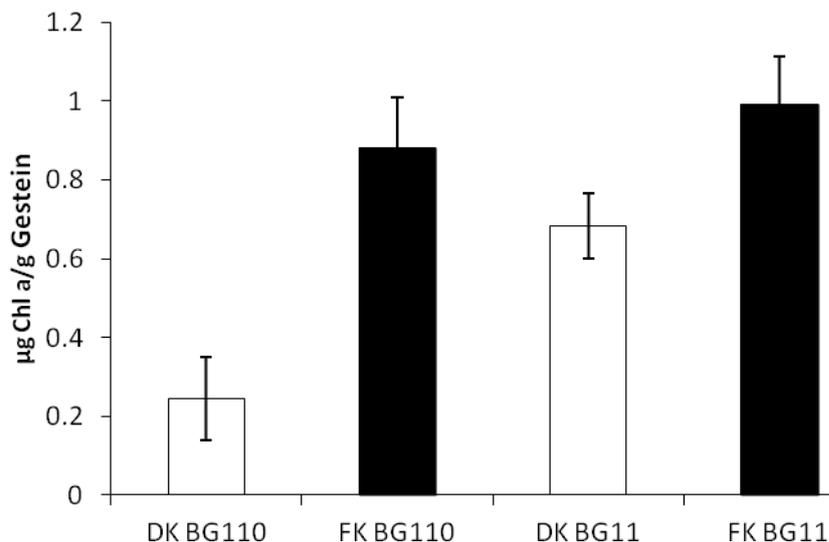


Abb.17: Finale Wachstumszustände von *N. punctiforme* auf Savonnières Kalkstein bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (in 2.2.3.2 beschrieben) in Mischkulturen mit *K. petricola* nach 4 Wochen Inkubation. Semikontinuierliche Kulturen erfolgten in Durchfluss-Kammern (DK), diskontinuierliche in feuchten Kammern (FK); die Kultivierung erfolgte in BG11<sub>0</sub> und in BG11 Medium. Es wurden die Chl a Gehalte der auf den Gesteinen vorkommenden *N. punctiforme*-Zellen in 90% Methanol gemessen (n=3).

Bei der Betrachtung der Biofilmstruktur konnten allerdings Differenzen zwischen den Kultivierungsbedingungen und abhängig vom verwendeten Gestein beobachtet werden. Dabei wurde eine Lektin-Bindungs-Analyse durchgeführt, die Aufnahmen erfolgten per CLSM (wie in 2.2.3.2 beschrieben). Zunächst wurden dazu Lektine identifiziert, welche

spezifisch an Zellen und EPS von *N. punctiforme* und *K. petricola* binden; ein Lektin, das spezifisch an EPS-Strukturen von *K. petricola* bindet, konnte nicht gefunden werden.

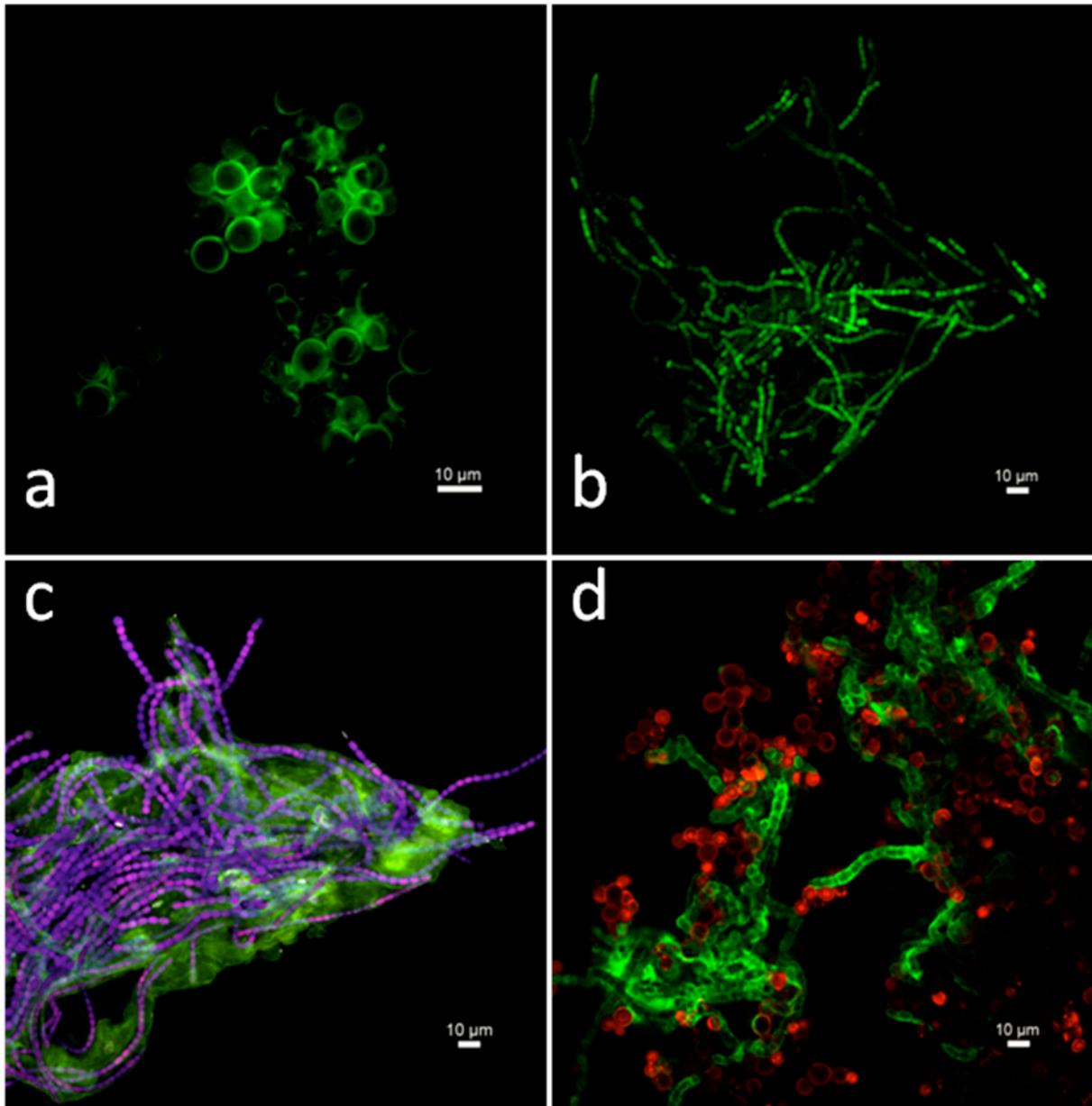


Abb.18: Einsatz identifizierter spezifischer Lektine, die für Lektin-Bindungs-Analysen der Struktur von Biofilmen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* auf verschiedenen Gesteinen und unter unterschiedlichen Bedingungen verwendet werden können. (a) UDA bindet spezifisch an Zellen von *K. petricola*. 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.

Für Zellen von *K. petricola* wurde das Lektin UDA ([191], isoliert aus *Urtica dioica*), für Zellen von *N. punctiforme* das Lektin LEA ([192], isoliert aus *Lycopersicon esculentum*) und für die *N. punctiforme*-EPS das Lektin AAL ([193], 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.18 gezeigt.

Durch die ausgewählten Lektine lassen sich demnach Zellen beider Biofilmpartner sowie die EPS von *N. punctiforme* in komplexen Biofilmstrukturen differenzierend visualisieren. Dies wurde für Biofilme auf Savonnières Kalkstein unter diskontinuierlichen und semikontinuierlichen Bedingungen sowie vergleichend für den Bewuchs von Baumberger Sandstein, Ettringer Tuff, Marmor und Postaer Sandstein unter diskontinuierlichen Bedingungen durchgeführt. Der Vergleich unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen ist in Abb.19 dargestellt.

Generell ist festzustellen, dass sich die Zellen von *K. petricola* in den unteren Schichten des Biofilms befinden, unabhängig von der verwendeten Kultivierungsbedingung. Diese Art der räumlichen Aufteilung mit *N. punctiforme*-Zellen in den oberen und *K. petricola*-Zellen in den unteren Schichten ist aus vorhergehenden Studien mit dem hier verwendeten Biofilm bekannt [148]. Nur die *N. punctiforme*-Zellen bilden eine nachweisbare EPS-Schicht aus, die nicht nur vor Witterungsbedingungen schützen sondern auch einen stabilisierenden Effekt auf den Zusammenhalt der Zellen haben kann (Abb.18c). Die starke EPS-Produktion in natürlichen Biofilmen durch Cyanobakterien ist weitreichend beschrieben [112, 113, 118] und für *Nostoc*-Arten ist bekannt, dass die EPS bis zu 60% des Trockengewichts eines Biofilms ausmachen kann [115]. Auch speziell für *N. punctiforme* konnte die Ausscheidung zahlreicher extrazellulärer Proteine und Metabolite unter optimalen und Stickstoffmangelbedingungen gezeigt werden [207]. Die *N. punctiforme*-Zellen können durch die EPS-Ausscheidung und durch ihr weniger kompaktes Wachstum gegenüber *K. petricola* einfacher größere Areale auf einer Gesteinsoberfläche besiedeln und somit auch höhere Schichten im Biofilm einnehmen. Die *K. petricola*-Zellen wachsen hingegen direkt an der Grenzfläche zum Gestein und bilden 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 [13].

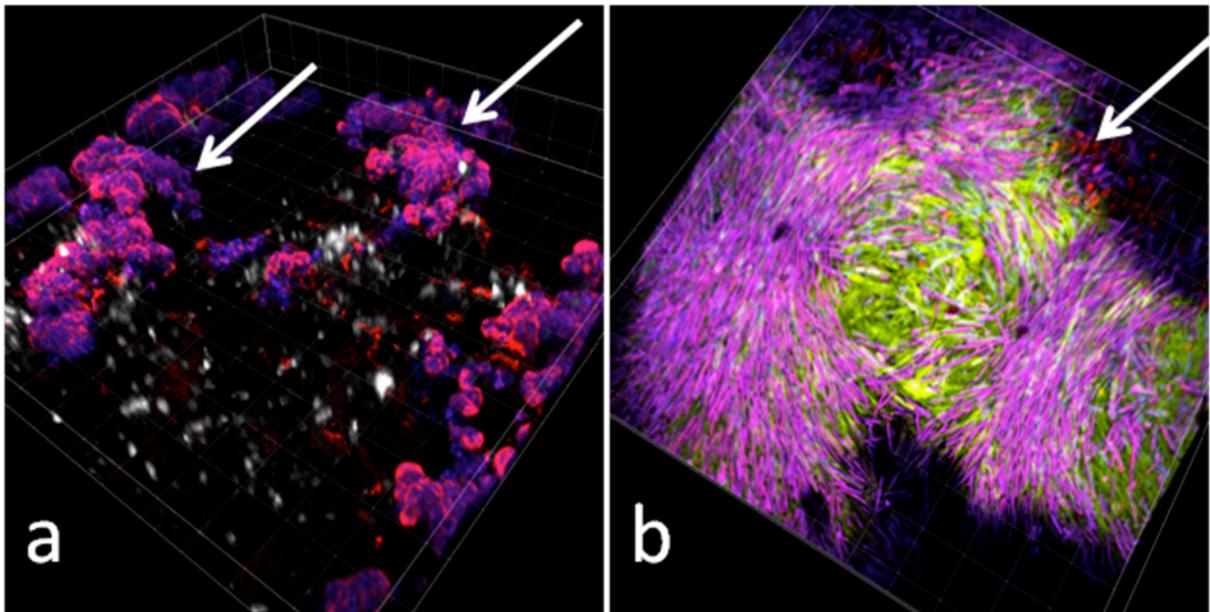


Abb.19: Vergleich der Struktur gewachsener Biofilme aus *K. petricola* und *N. punctiforme* nach 4 Wochen Inkubation auf Savonnières Kalkstein unter (a) diskontinuierlichen Bedingungen in einer feuchten Kammer und unter (b) semikontinuierlichen Bedingungen in einem Durchfluss-System. (a) *K. petricola*-Zellen erscheinen weiß (Calcofluor-White-Färbung) und sind im unteren Teil des Biofilms als einzelne Zellen oder Mikrokolonien zu finden. *N. punctiforme*-Zellen erscheinen violett (Autofluoreszenz) und sind in kompakten Zellpaketen angeordnet (durch weiße Pfeile markiert). Auf den Zellpaketen liegen teilweise EPS, die rosafarben erscheinen (A568-Bindung), vereinzelt kommen auch zwischen den Zellpaketen EPS vor, in dem Fall erscheinen sie rot. (b) *N. punctiforme*-Zellen erscheinen violett (Autofluoreszenz) und wachsen filamentös. *N. punctiforme*-EPS erscheinen grün (A488-Bindung) und werden massiv zwischen den *N. punctiforme*-Filamenten ausgebildet. *K. petricola*-Zellen erscheinen rot (TRITC-Bindung) und sind im unteren Teil des Biofilms als einzelne Zellen oder Mikrokolonien zu finden. Aufgrund der massiven EPS-Ausscheidung und der hohen Anzahl an *N. punctiforme*-Filamenten sind die *K. petricola*-Zellen nur im Randbereich (durch weiße Pfeile markiert) erkennbar, sie lagen allerdings flächendeckend in niedrigeren Biofilmschichten vor.

Die unterschiedliche Morphologie der *N. punctiforme*-Zellen bei den verschiedenen Bedingungen geht sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlich gute Wasserverfügbarkeit zurück. Unter Stressbedingungen können Cyanobakterien Zellpakete ausbilden, wie sie in den Experimenten hier beobachtet wurden [157]. 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, welches in seiner Funktion als Wasserspeicher normalerweise sehr viel Wasser enthält [112, 113, 115]. Durch die geringere Wasserverfügbarkeit und die daraus resultierende nachweislich geringere EPS-Produktion (Abb.19a) 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 (Abb.19b). Die Zellen selbst wachsen wie in Flüssigkulturen filamentös und können so größere Areale auf dem Gestein besiedeln.

Der Vergleich des Wachstums auf unterschiedlichen Gesteinen unter diskontinuierlichen Bedingungen ist in Abb.20 dargestellt. Ebenso wie beim Vergleich der verschiedenen Kultivierungsbedingungen 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.

Die *N. punctiforme*-Zellen hingegen erscheinen besonders hinsichtlich der ausgebildeten EPS abhängig vom als Substrat verwendeten Gestein variabel. Auf Marmor zeigen sie filamentöses Wachstum, allerdings ist hier keine EPS-Schicht zu erkennen (Abb.20a). Dies ist insofern verwunderlich, als die Ausbildung von Filamenten meist bei genügend hoher Wasserverfügbarkeit stattfindet und daher auf einem festen Substrat normalerweise mit der Bildung einer EPS-Schicht zur Speicherung von Wasser verbunden ist. Da der hier verwendete Marmor das einzige der benutzten Gesteine darstellt, in dem keine relevante Aufnahme an Wasser in das Gesteinsinnere auftritt, kann auch kein Wasser von den Filterpapieren der feuchten Kammer die Biofilme direkt über das Gestein erreichen. Auf den anderen Gesteinen, bei denen dies aufgrund ihrer Porosität der Fall ist, wachsen die *N. punctiforme*-Zellen in Zellpaketen (Abb.20b-d). Möglicherweise spielt die relativ glatte Oberfläche eine Rolle; Bewuchs von Materialien wird generell durch die Rauheit der Oberfläche beeinflusst [210], eine glattere Oberfläche kann dementsprechend die Kolonisierung erschweren [213]. Speziell für Marmortypen wurde in Laborexperimenten im Vergleich zu raueren Kalksteinen eine deutlich geringere Kolonisierung mit anderer, flacherer Biofilmstruktur gezeigt [210]. Wenn das Anhaften von Zellpaketen durch die glatte Oberfläche in irgendeiner Form behindert wird, könnte dies ein filamentöses Wachstum auch unter Bedingungen mit geringer Wasseraktivität begünstigen. Die auf dem Marmor beobachteten Filamente (Abb.20a) erscheinen schwächer gefärbt als die auf dem Savonnières Kalkstein unter semikontinuierlichen Bedingungen (Abb.19b) oder auf Deckgläschen (Abb.18c) gewachsene. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen gestresst sind. Unter Stressbedingungen werden normalerweise Überdauerungsformen wie Akineten, mobile Formen wie Hormogonien oder die auf anderen Gesteinsoberflächen beobachteten Zellpakete ausgebildet [175].

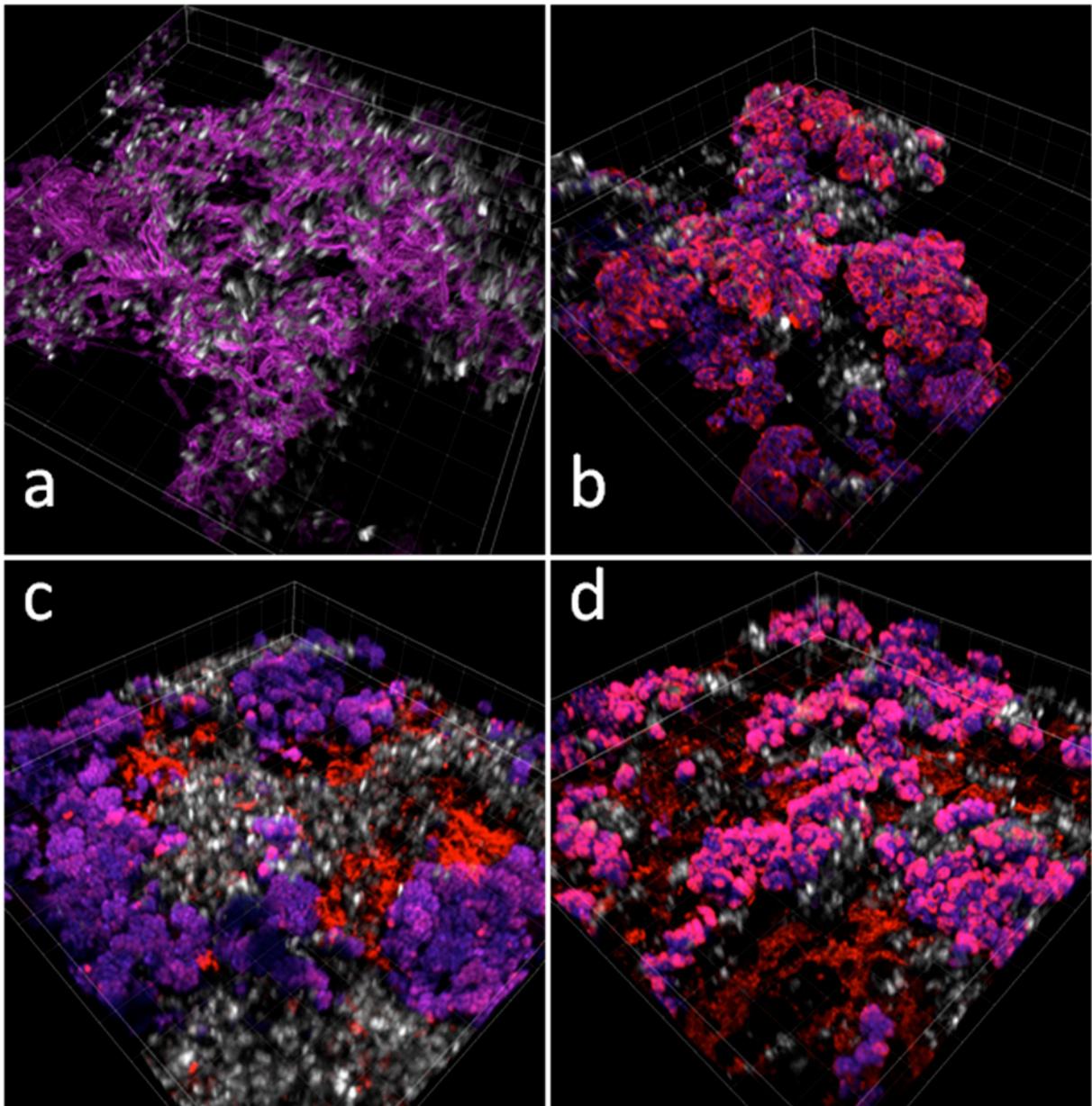


Abb.20: Vergleich der Struktur gewachsener Biofilme aus *K. petricola* und *N. punctiforme* nach 4 Wochen Inkubation unter diskontinuierlichen Bedingungen in einer feuchten Kammer auf (a) Marmor, (b) Postaer Sandstein, (c) Ettringer Tuff und (d) Baumberger Sandstein. (a) *K. petricola*-Zellen erscheinen 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.

Die Entstehung und Funktion von Zellpaketen ist in der Literatur viel diskutiert [157]: 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 anderen Gesteinen aber schon.

Ebenfalls zwischen den weiteren der verwendeten Gesteine konnten bzgl. der Biofilmstruktur Unterschiede beobachtet werden. Bei Wachstum auf Postaer Sandstein werden die *N. punctiforme*-EPS auf der Oberfläche der Zellpakete ausgebildet (Abb.20b), aber nicht zwischen Zellpaketen. Bei Wachstum auf Ettringer Tuff hingegen liegen die *N. punctiforme*-EPS ausschließlich zwischen den Zellpaketen (Abb.20c), während sie auf Baumberger Sandstein sowohl zwischen als auch auf der Oberfläche von Zellpaketen zu finden sind (Abb.20d).

Die Gesteine unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung (Tab.2, 2.1.1.1), sondern auch bzgl. der Parameter Porosität, Wasseraufnahme und spezifischer Oberfläche, was Effekte auf die Kolonisierung ausmachen kann [210]. Ettringer Tuff ist ein Vulkangestein mit zahlreichen Einschlüssen und einer mikrokristallinen bis glasigen Grundmasse; er zeigt unter den verwendeten Gesteinen die größte Diversität an Elementen in seiner chemischen Zusammensetzung (Tab.2, 2.1.1.1) sowie die höchste Porosität, Wasseraufnahme und spezifische Oberfläche (Tab.1, 2.1.1.1). Die zunehmende Kolonisierbarkeit eines Gesteins mit zunehmender Porosität wird mit der größeren Wasserspeicherung und damit -verfügbarkeit für Mikroorganismen in Verbindung gebracht [209, 210]. Diese Annahme ist konsistent bzgl. gemessener Porositäts- und Wasseraufnahmewerte des Ettringer Tuffs. Die vergleichsweise hohe Verfügbarkeit an unterschiedlichen chemischen Elementen suggeriert eine generelle Begünstigung dieses Gesteins für Bewuchs, die sich auch in der Struktur des Biofilms niederschlagen kann. Höhere Zellzahlen konnten allerdings in Schüttelkulturen auf Ettringer Tuff gegenüber Baumberger Sandstein nicht gezeigt werden (Abb.12, 13); für Savonnières Kalkstein, der deutlich weniger Elementdiversität in seiner chemischen Zusammensetzung zeigt, wurden hingegen die höchsten Zellzahlen bzgl. *N. punctiforme* beobachtet. Es scheinen also zumindest teilweise auch andere Gesteinseigenschaften eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Porosität muss nicht nur zusammen mit der Wasseraufnahme sondern auch mit der spezifischen Oberfläche betrachtet werden, was bei einem Vergleich von Baumberger und Postaer Sandstein deutlich wird. Die Porosität ist bei beiden Gesteinen ebenso wie die

Wasseraufnahme nahezu gleich, während sich die spezifischen Oberflächen stark unterscheiden (Tab.1, 2.1.1.1). Spezifische Oberflächen hängen von unterschiedlichen Rauigkeiten und Porengrößen innerhalb des Gesteins ab; der Anteil an Poren mit einem Durchmesser von  $\leq 0,1 \mu\text{m}$  ist bei Baumberger Sandstein (und auch bei Ettringer Tuff) mit 30% der größte [183], bei Postaer Sandstein hingegen haben die meisten Poren einen Durchmesser von etwa  $10 \mu\text{m}$  [184]. Die größere spezifische Oberfläche von Baumberger Sandstein geht also in jedem Fall auch auf die geringere mittlere Porengröße zurück. Geringere Durchmesser von Poren resultieren in einem stärkeren Kapillareffekt, weshalb auf der Oberfläche des Baumberger Sandsteins bei genügend Feuchtigkeit im unter dem Gestein liegenden Filterpapier vermutlich eine größere Wassermenge verfügbar wird als dies für den Postaer Sandstein der Fall ist. Da auch der Ettringer Tuff relativ geringe Porengrößen aufweist, ist es wahrscheinlich, dass Oberflächen des Postaer Sandstein zu stärkeren Wassermangelbedingungen führen als solche von Baumberger Sandstein oder Ettringer Tuff. Dies würde erklären, weshalb bei Wachstum auf den letzteren beiden Gesteinen deutlich mehr EPS gebildet werden, entweder durch sehr große Ausscheidungen zwischen den Zellpaketen wie auf Ettringer Tuff (Abb.20c) oder durch Ausscheidungen zwischen den Zellpaketen und auch große Mengen an EPS auf den Zellen wie auf Baumberger Sandstein (Abb.20d). Die EPS auf den Zelloberflächen der Biofilme auf Postaer Sandstein sind in Relation dazu deutlich weniger (Abb.20b). Darüber hinaus wurde auf Postaer Sandstein das geringste Wachstum bzgl. der Zellzahlen beobachtet.

Die relativ großen Porengrößen des Postaer Sandsteins könnten also für eine vergleichsweise geringere Wasseraktivität an der Oberfläche und somit weniger gebildete EPS verantwortlich sein; Postaer Sandstein besteht zudem zu 98% aus  $\text{SiO}_2$  und ist somit durch die relativ langsamen Auflöseraten von Quarz [214] wahrscheinlich relativ schwer für Mikroorganismen verfügbar bzw. angreifbar. Zudem wird Silizium bis auf einige Ausnahmen [80] in der belebten Welt sehr wenig verwendet und es sind keine biologischen organischen Moleküle bekannt, die Silizium enthalten oder benötigen [215]. Carbonate, die einen Großteil der Gesteine Marmor, Baumberger Sandstein und Savonnières Kalkstein ausmachen, besitzen dagegen generell relativ niedrige Auflöseraten [98, 216] und sind daher wahrscheinlich auch von Mikroorganismen einfacher angreifbar. Zudem werden Calcium nicht unwichtige Rollen in Eukaryoten im Fall von Calmodulin und Calcineurin [217] sowie in Prokaryoten in Prozessen wie Chemotaxis, DNA-Replikation, Phospholipidsynthese und Proteinphosphorylierung [218] zugeschrieben. Savonnières Kalkstein und Baumberger Sandstein sind fossilführend und enthalten biogene Kalkschalen. Für Kalksteine konnte gezeigt werden, dass die Besiedlung der Porenräume davon abhängt, ob das Gestein biogen ist oder nicht [219]. In nicht biogenen Gesteinen wird zunächst der Porenraum zwischen den einzelnen Kristallen besiedelt, in biogenen Gesteinen wird sekundär durch

Auflöseprozesse gebildeter Porenraum besiedelt. Die letztgenannte Form der Besiedlung könnte sich auch positiv auf die Wasseraktivität an Gesteinsoberflächen auswirken, indem Wasser aus niedriger liegenden Poren, die keinen direkten Kontakt zur Oberfläche hatten, durch sekundäre Porenbildung verfügbar gemacht wird. Natürlich finden Auflösungsprozesse auch bei der Besiedlung nicht biogener Gesteine statt, durch den differierenden Besiedlungsmechanismus aber möglicherweise zu späteren Zeitpunkten.

Zusammenfassend lässt sich also bisher feststellen, dass bei der vergleichenden Analyse der Besiedlung verschiedener Gesteine bzgl. der Biofilmstruktur unter den Bedingungen der feuchten Kammer deutliche Unterschiede auf Marmor beobachtet wurden (Abb.20a), wo *N. punctiforme*-Zellen filamentös wachsen und keine nachweisbaren EPS bilden. Der Unterschied wäre theoretisch durch die gegenüber den anderen Gesteinen viel glattere Oberfläche des Marmors erklärbar. Weiterhin zeigte sich, dass auf Postaer Sandstein deutlich weniger EPS gebildet werden als auf Ettringer Tuff und Baumberger Sandstein (Abb.20b), auf all diesen Gesteinen findet jedoch ein Wachstum der *N. punctiforme*-Zellen in Form von Zellpaketen statt (Abb.20b-d). Da Postaer Sandstein größere mittlere Porengrößen aufweist als die anderen Gesteine und zudem aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung weniger Nährstoffe und Angriffspunkte für Auflösungsprozesse liefert, ließe sich die geringere EPS-Produktion über eine kleinere Wasseraktivität und weniger verwendbare Nährstoffe aus dem Gestein erklären. Diese möglichen Erklärungen können allerdings aufgrund des experimentellen Aufbaus nicht als endgültig betrachtet werden, da dafür eine Reduktion der experimentellen Bedingungen auf einzelne jeweils zu untersuchende Eigenschaften stattfinden müsste. Sie sind aber dennoch aufgrund der beobachteten Biofilmstrukturen (Abb.20) und der chemischen und physikalischen Fakten der Gesteine (Tab.1, 2, 2.1.1.1) plausibel und die Experimente tragen zum Verständnis der Kolonisierung von Baustoffen unterschiedlicher Zusammensetzung bei.

Gründe für die unterschiedliche Ausscheidung von EPS durch *N. punctiforme* auf Ettringer Tuff und Baumberger Sandstein bleiben aber unklar. In Biofilmen sind Zellen oft in eine Matrix aus den ausgeschiedenen EPS eingebettet [220]. Dies trifft am meisten für die Organisation des Modellbiofilms auf Baumberger Sandstein zu, wo die EPS zwischen und auf den Oberflächen der Zellen vorkommen. Die EPS-Schicht ist als Ansammlung von gelösten Zuckern und Proteinen ein Nährstoffreservoir, das dem Biofilm nicht nur Stabilität verleiht, sondern auch den Austausch von Nährstoffen und Signalmolekülen erlaubt. Es ist auch der Raum für Exoenzyme, welche innerhalb der EPS-Matrix vorkommende Stoffe hydrolysieren und damit verfügbar machen können. Der Raum zwischen den Zellen spielt also eine entscheidende Rolle in Biofilmen. Durch die Aktionen von Exoenzymen und die Ausscheidung weiterer Metabolite durch die Zellen ist die EPS-Matrix einem ständigen

Wechsel unterworfen, der auch stark von den Umweltbedingungen abhängig ist [220]. Wasseraktivität und Nährstoffkonzentrationen sind dabei wichtige Faktoren. Unter nährstoffarmen Bedingungen werden in der EPS-Schicht vorkommende Nährstoffe durch die Zellen aufgenommen; liegt zudem Wassermangel vor, kann auf das Wasser der EPS-Schicht zurückgegriffen werden, die dadurch schrumpft. Die Tatsache, dass auf den Zelloberflächen des Biofilms auf Baumberger Sandstein EPS zu sehen sind (Abb.20d), spricht dafür, dass diese hier immer noch von den Zellen gebildet werden, während dies beim Ettringer Tuff möglicherweise nicht mehr der Fall ist, sodass dort nur die bereits vorher ausgeschiedenen EPS zwischen den Zellen zu sehen sind (Abb.20c). Die vergleichende Aufklärung der chemischen Struktur der EPS-Matrices kann entscheidende Informationen zur Abhängigkeit dieser vom Gestein liefern. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst beim Vergleich des Wachstums unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen versucht und wird im Folgenden vorgestellt.

### **Biochemische Charakterisierung der EPS**

Die biochemische Analyse der hydrolysierten EPS-Bestandteile per HPLC ergab keine reproduzierbaren Ergebnisse. Es konnten 4 Monosaccharide nachgewiesen werden: Galactose, Glucose, Mannose und Sorbitol. Generell wurden in den Proben, die unter semikontinuierlichen Bedingungen inkubiert wurden, höhere Zuckerkonzentrationen gemessen; zwischen den experimentellen Parallelen gab es jedoch sehr starke Unterschiede. In einer Probe wurden hohe Konzentrationen an Galactose, Glucose und Mannose und eine halb so große Konzentration an Sorbitol gemessen, in einer anderen Probe war Sorbitol die stärkste Fraktion unter den 4 gemessenen Zuckern, in weiteren Proben wurde jeweils nur Mannose bzw. Sorbitol gemessen. Ähnlich verhält es sich mit den Proben, die unter diskontinuierlichen Bedingungen inkubiert wurden. Hier wurden nur in einem Replikat alle 4 Saccharide gemessen, in den anderen lagen laut Messung sehr niedrig konzentrierte bzw. gar keine Saccharide vor.

Sorbitol entsteht durch die Reduktion von Glucose und diese Reaktion kann wahrscheinlich auch ohne Katalysatoren oder Enzyme durch Disproportionierung stattfinden [221]. In diesem Fall müsste man allerdings auch Gluconsäure in den Proben finden, was nicht der Fall war. Die nicht vorhandene Reproduzierbarkeit mit auffällig schwankenden Sorbitolkonzentrationen, welche beobachtet wurde, lassen darauf schließen, dass auch artifizielle Effekte hier nicht auszuschließen sind. Die Gründe für die nicht reproduzierbaren Ergebnisse sind in der EPS-Extraktion und der anschließenden Hydrolyse zu suchen. Die Extraktion wurde nach einem etablierten Protokoll [197] mit 2%iger EDTA-Lösung durchgeführt (2.2.3.2). Wenn die Trennung von EPS und Zellen nicht vollständig abläuft,

führt dies zu Kontaminationen durch Zellbestandteile; treten diese nur in einigen Proben auf, kann das zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen. Die Hydrolyse der Polysaccharide mit Trifluoressigsäure erfolgte nach [198] für 8 h bei 110°C, anschließend wurde die Säure über Nacht bei 74°C abgedampft (2.2.3.2). Hohe Temperaturen und die Aktivität von Säuren können zu Isomerisierungen von Monosacchariden, deren Abbau zu Carbonsäuren und in Anwesenheit von Proteinen oder Aminosäuren auch zu Maillardreaktionen führen [222, 223]. Nach der Hydrolyse der Polysaccharide in die einzelnen Monosaccharide sind also weitere Reaktionen nicht ausgeschlossen. Das Austesten alternativer Ansätze bzw. die Modifikation des durchgeführten Hydrolyseverfahrens mit kürzeren Inkubationszeiten bei hohen Temperaturen bzw. geringer konzentrierter Säure sind mögliche Änderungen, um die Ergebnisse reproduzierbar zu machen.

### 3.3 Gesteinsverwitterung

#### 3.3.1 Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen

Bei der vergleichenden Analyse der Elementanreicherung in Gesteinsbiofilmen (Methodik in 2.2.4 beschrieben) wurden auf allen verwendeten Gesteinen Biofilme gebildet, die per Mikrosondenanalytik auf die chemische Zusammensetzung hin untersucht wurden. Teilweise konnten Spuren eines Materialangriffs beobachtet werden, wie in Abb.21 für Marmor zu sehen ist.

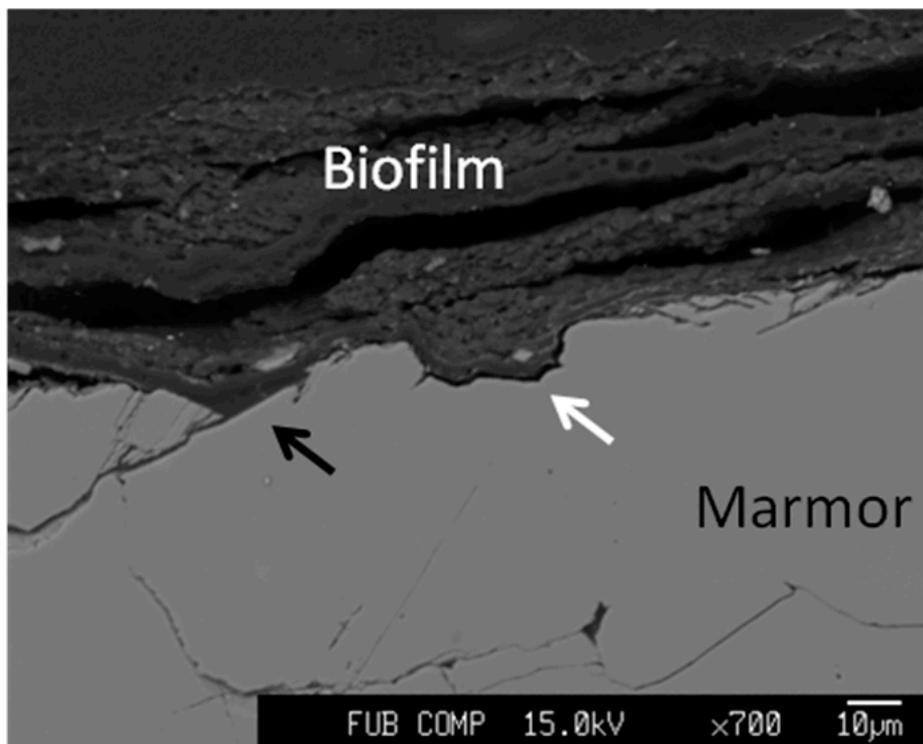


Abb.21: Mikrosondenaufnahme eines Dünnschnittpräparats im Querschnitt an der Grenzfläche zwischen Gestein und Biofilm nach 59 d Wachstum in Schüttelkultur auf dem Gestein. Man sieht die nach dem Autoklavieren verdichtete Biofilmstruktur auf Marmorgestein. Während einige Bruchstellen (markiert durch einen schwarzen Pfeil) aufgrund ebener Kanten geordnet erscheinen und wahrscheinlich aufgrund physikalischer Faktoren z.B. während der Präparation des Dünnschliffs herausgebrochen wurden, erscheinen andere (markiert durch einen weißen Pfeil) wellig und uneben; diese Strukturen kamen höchstwahrscheinlich im Verlauf des Experiments z.B. durch den Angriff von Mikroorganismen zustande.

Wenn einzelne Kristallkörner innerhalb eines Minerals durch artifizielle Prozesse wie z.B. während der Präparation der Dünnschliffe für die Mikrosondenanalyse herausgebrochen werden, geschieht dies aufgrund der symmetrischen Form einzelner Kristalle meist derart, dass Bruchstellen mit ebenen Kanten im Präparat zurückbleiben, die saubere Ecken

aufweisen oder im Fall runder herausgebrochener Körner kreisrund erscheinen. Eine unebene, wellige Einkerbung geht meist auf andere Prozesse z.B. chemischer Natur zurück, wo der Materialangriff zufällig verteilt auf der entsprechenden Oberfläche geschieht und sich auch innerhalb einzelner Kristallkörner in alle Richtungen fortbewegen kann. Beide Situationen sind in Abb.21 zu sehen. Die asymmetrischen Einkerbungen mit dem unmittelbar an der Grenzfläche liegenden Biofilm sprechen hierbei für einen biotisch induzierten Materialangriff des Marmors.

Bei dem quantitativen Vergleich der prozentualen Elementzusammensetzung in Biofilmen, die auf den Gesteinen Baumberger Sandstein, Ettringer Tuff, Marmor, Postaer Sandstein und Savonnières Kalkstein in Schüttelkulturen in BG11 Medium inkubiert wurden, zeigten sich Unterschiede (Abb.22). Die Anreicherung von Elementen aus einer Minerallösung (BG11) ist also abhängig vom als Festsubstrat angebotenen Gestein. Die BG11 Minerallösung war in jedem Parallelansatz die gleiche und hatte eine definierte Zusammensetzung an Elementen (beschrieben in 2.1.3.2, nach [184]). Eine signifikant höhere Anreicherung von Schwefel in den Biofilmen wurde bei Wachstum auf Marmor und Savonnières Kalkstein beobachtet (Abb.22). Laut chemischer Untersuchung (Tab.2, 2.1.1.1) enthält Savonnières Kalkstein einen nachweisbaren Schwefelanteil, nicht aber der verwendete Marmor. Alle in Abb.22 aufgeführten Elemente mit Ausnahme von Aluminium sind in der BG11 Nährlösung vorhanden und können daher aus dieser im Biofilm angereichert werden. In Biofilmen angereicherter Schwefel kann also auch aus den in der Nährlösung vorhandenen Sulfaten stammen. Kupfer wird anteilmäßig deutlich stärker bei Wachstum auf Postaer Sandstein angereichert, ist in diesem aber nicht nachweisbar. Das gemessene Aluminium kann nicht aus der Nährlösung kommen; mögliche Ursprünge sind sämtliche Alumosilikate in den verwendeten Gesteinen, wie z.B. im Marmor vereinzelt vorhandene Phlogopitplättchen (wurden in Mikrosondenanalysen beobachtet). Für die weiteren Elemente war prinzipiell eine Anreicherung aus der Nährlösung oder ein Herauslösen aus dem Gestein möglich. Wie groß die jeweiligen Anteile beider Prozesse an der Elementzusammensetzung in den Biofilmen sind, lässt sich aufgrund des experimentellen Aufbaus nicht eruieren. Weiterhin sind chemische Kontaminationen nicht auszuschließen, die entweder in den verwendeten Chemikalien oder den verwendeten Gefäßen begründet liegen können. In Anbetracht dessen sind die gemessenen Konzentrationen der Elemente Aluminium, Chlor, Natrium, Phosphor und Magnesium mit Vorsicht zu betrachten, da sie sich in einer relativ geringen Größenordnung bewegen und die Messungen generell starke Schwankungen zeigten.

Dennoch ist aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen von Schwefel, Calcium und Kupfer zu erkennen, dass eine differenzielle Anreicherung von Elementen abhängig vom

Substrat stattfindet, da die verwendeten Nährlösungen und Mikroorganismen die gleichen waren und sich die experimentellen Parallelen nur bzgl. des verwendeten Gesteinssubstrats unterschieden. Eine Anreicherung von Elementen innerhalb von Biofilmen durch Präzipitation ist ein entscheidender Schritt in der Formation von Stromatolithen [166] und die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass dieser Schritt in Abhängigkeit vom Gesteinssubstrat und damit verschiedenen Nährstoffbedingungen von Mikroorganismen in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden kann.

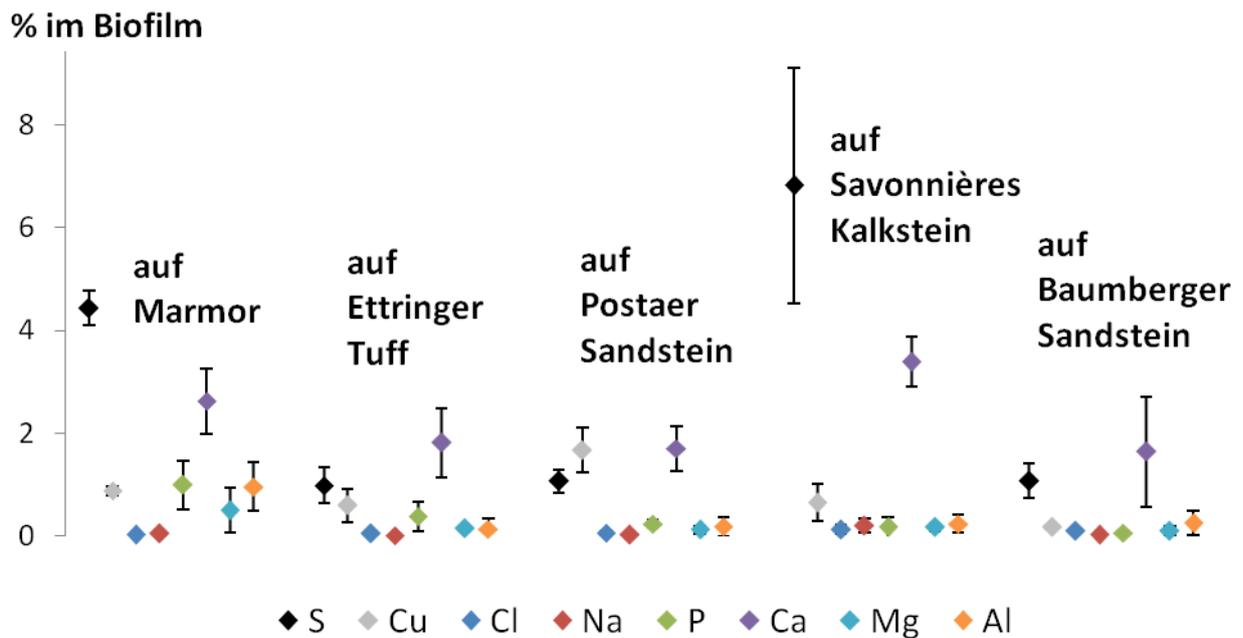


Abb.22: Prozentuale Elementverteilung in Biofilmen nach Wachstum für 59 d auf verschiedenen Gesteinen in Schüttelkulturen in BG11 Medium (pH 6). Nach dem Experiment wurden die Gesteine mit Biofilm für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert und Dünnschliffpräparate hergestellt. Die chemische Analyse der Biofilme erfolgte per EDS mit der Mikrosonde (JEOL JXA 8200 Superprobe). Für Biofilm-Messpunkte auf Postaer Sandstein war n=14, für solche auf den anderen Gesteinen war n=6. Der mit Abstand prozentual größte Anteil lag stets für Kohlenstoff vor (meist  $\geq 95\%$ ) und wird hier nicht aufgeführt.

### 3.3.2 Verwitterung von Granit

Eine mineralogische Analyse von Dünnschliffpräparaten von dem für die Verwitterungsversuche verwendeten Granit im Ausgangszustand ergab, dass er hauptsächlich aus Plagioklas, einem Kalium-reichen Feldspat, Quarz und Biotit bestand. Zusätzlich konnten vereinzelt Magnetit, Titanit und Ilmenit sowie in Mikroeinschlüssen Zirkon, Calcit und Apatit nachgewiesen werden. Der Kalium-reiche Feldspat zeichnete sich durch eine starke Mikroporosität aus und ähnelte von seiner chemischen Zusammensetzung her Mikroklin, welcher die Verhältnisformel  $K(AlSi_3O_8)$  besitzt, enthielt aber zusätzlich geringe Mengen Natriums (Abb.23). Der Biotit zeigte in seinen Randzonen eine Chloritisierung, d.h. eine Umwandlung in Chlorit (Abb.23). Die Chloritisierung ist ein hydrothermaler Prozess, bei dem Kalium aus den Zwischenschichten des Biotitgitters heraustritt und bei genügend hohen Wasserdampfdrücken und  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen durch hydratisierte Magnesiumionen ersetzt wird [224]. Die Chloritisierung von Biotit in Graniten ist bekannt und kann zur Erhöhung des Kaliumionenreservoirs für metasomatische Prozesse in Gesteinen beitragen [224]. EDS-Messungen der Biotitphasen zeigten ähnliche Elementverhältnisse wie in der Idealformel  $K(Mg;Fe^{2+})_3(Al;Fe^{3+})Si_3O_{10}(OH;F)_2$ , solche für Chloritphasen zeigten eine vollständige Abwesenheit von Kalium.

Der Plagioklas ähnelte in seiner elementaren Zusammensetzung Albit, welcher die Verhältnisformel  $Na_{1,0-0,9}Ca_{0,0-0,1}(AlSi_3O_8)$  besitzt. Teilweise wurde zentral im Mineralkorn eine beginnende Serizitisierung beobachtet (Abb.24), worunter man die metasomatische Bildung von Serizit ( $KAl_2(OH,F)_2AlSi_3O_{10}$ ) aus Feldspäten unter Zufuhr von Kalium durch hydrothermale Prozesse versteht.

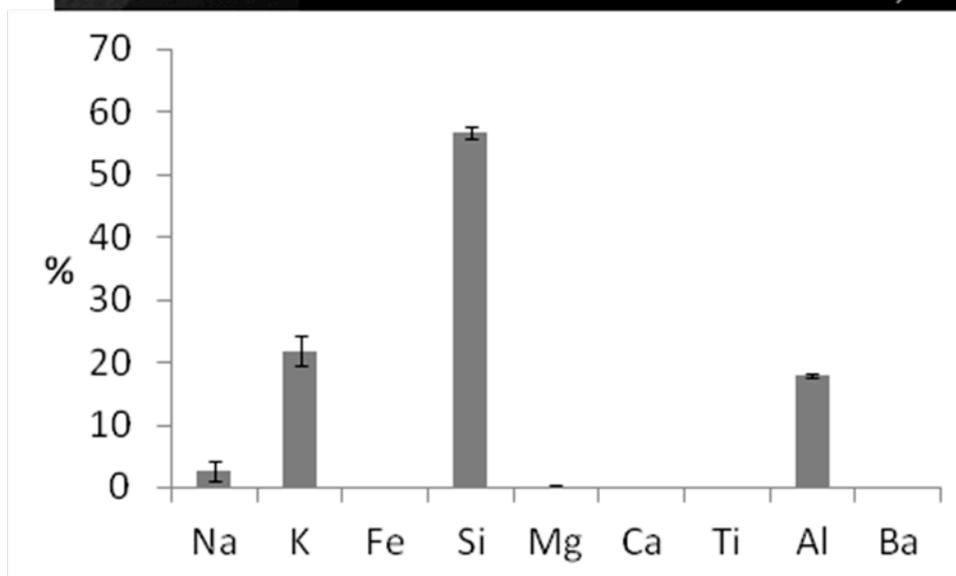
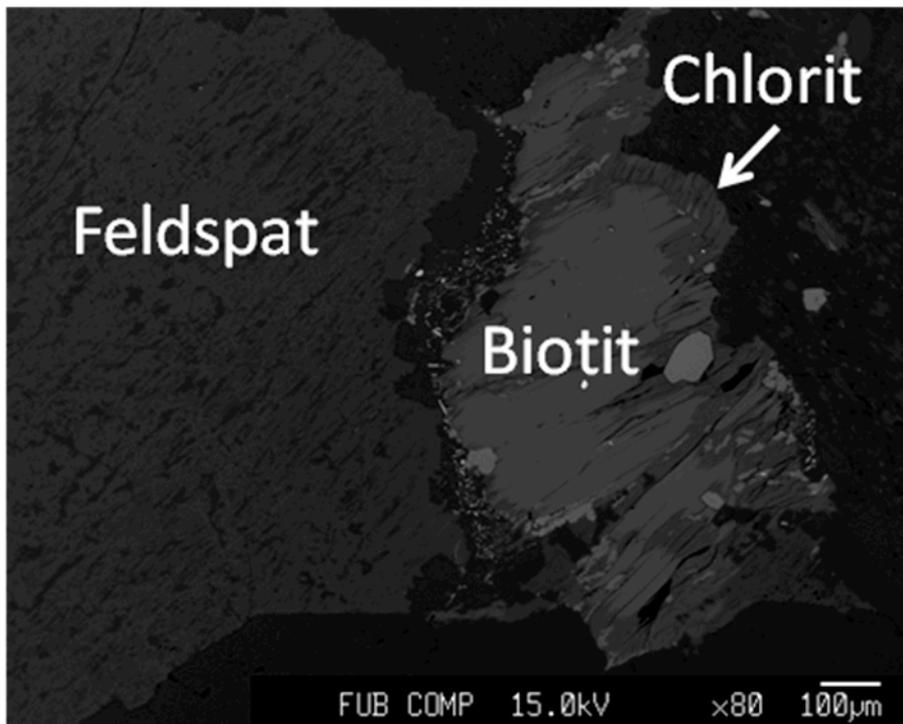


Abb.23: Oben: Mikrosondenaufnahme von Feldspat und Biotit innerhalb eines Dünnschliffpräparats des verwendeten Granits *a priori*. Der Feldspat zeichnet sich durch Mikroporosität aus (dunklere Punkte innerhalb der Feldspatphase). Der Biotit zeigt am Rand dunklere Zonen (markiert durch einen weißen Pfeil), die auf die dort einsetzende Umwandlung in Chlorit zurückzuführen sind. Unten: EDS-Messungen (n=13) des Feldspates ergaben bzgl. des Kationenverhältnisses eine dem Mikroklin ( $K(AlSi_3O_8)$ ) ähnliche Zusammensetzung mit zusätzlich geringen Mengen Natriums.

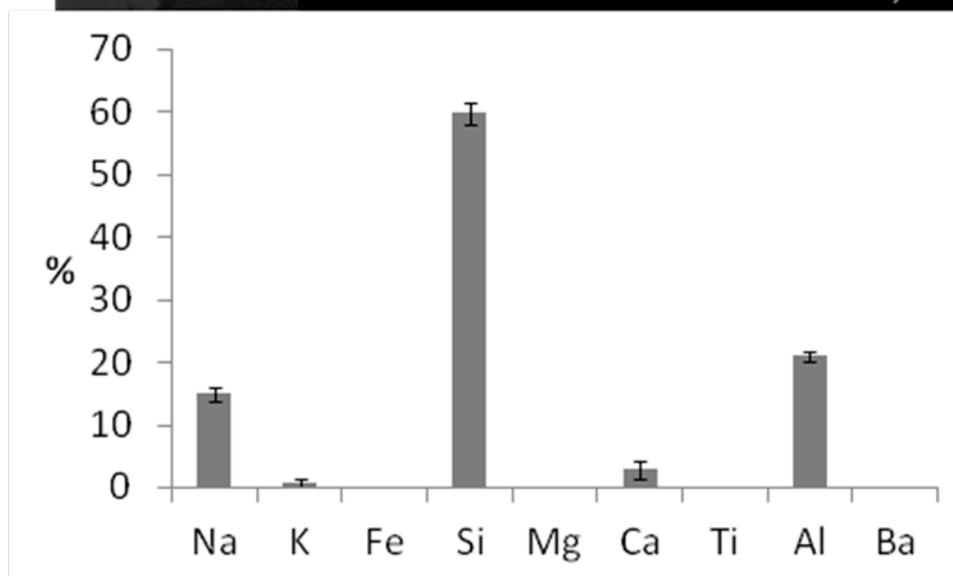
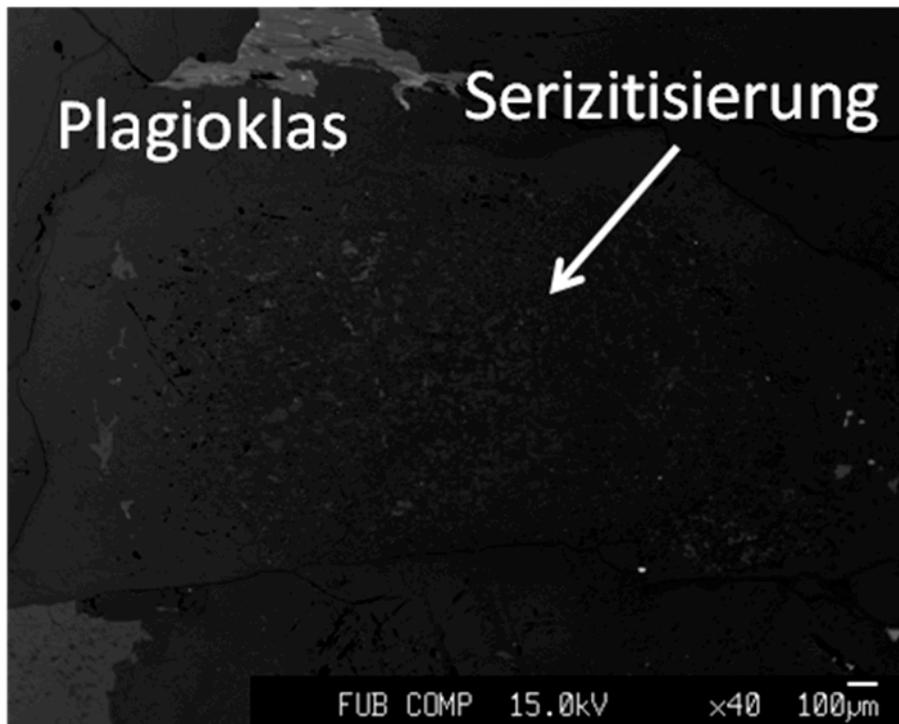


Abb.24: Oben: Mikrosondenaufnahme von Plagioklas innerhalb eines Dünnschliffpräparats des verwendeten Granits *a priori*. Der Plagioklas zeigt im zentralen Teil eine beginnende Serizitisierung (markiert durch einen weißen Pfeil). Unten: EDS-Messungen (n=21) des Plagioklases ergaben bzgl. des Kationenverhältnisses eine dem Albit ( $\text{Na}_{1,0-0,9}\text{Ca}_{0,0-0,1}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$ ) ähnliche Zusammensetzung.

Nach Ablauf des Durchflussexperiments (Methodik beschrieben in 2.2.5.1) wiesen in den Eluaten nur die Elemente Mangan, Magnesium, Natrium, Calcium, Barium, Zink und Kalium quantifizierbare Konzentrationen auf. Dabei zeigt sich ein Trend zu mit der Zeit zunehmendem Übergang in die gelöste Phase für die entsprechenden Elemente, wenn man Messwerte nach 45 und nach 180 d Inkubationszeit vergleichend betrachtet (Abb.25, 26). Da es sich um einen geschlossenen Kreislauf und somit um ein Anreicherungsexperiment handelte, war auch zu erwarten, dass die Konzentrationen im Eluat für aus dem Gestein

herauslösbare Elemente mit der Zeit zunehmen. Unterschiede zwischen den biotischen und den abiotischen Proben zeigten sich für die Elemente Mangan, Magnesium, Natrium und Calcium (Abb.25), nicht aber für die Elemente Barium, Zink und Kalium (Abb.26).

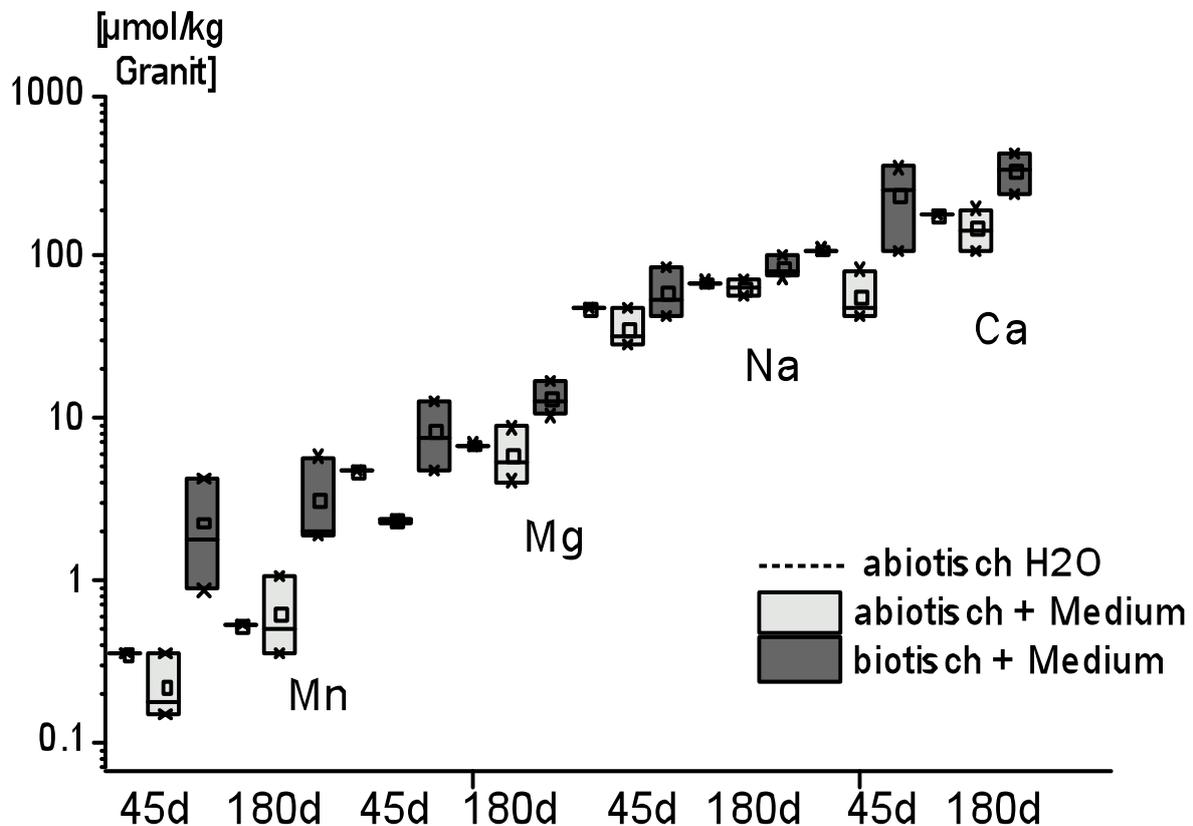


Abb.25: Per ICP-MS/OES gemessene Elementkonzentrationen in den Eluaten der Durchfluss-Experimente zur Granitverwitterung (Methodik beschrieben in 2.2.5.1) nach 45 und 180 d Inkubation für die Elemente Mn, Mg, Na und Ca in einer Boxplot-Darstellung (n=3 für biotische und abiotische Proben mit Medium, n=1 für abiotische Proben mit Wasser). Für alle hier aufgeführten Elemente ist ein ansteigender Trend der Konzentration vom ersten zum zweiten Messzeitpunkt zu erkennen. Zudem sind die Konzentrationen für die biotischen Proben jeweils höher als für die abiotischen.

In Studien zur biotisch induzierten Gesteinsverwitterung wurden unter Verwendung unterschiedlicher Organismen und Analysetechniken bisher hauptsächlich Calcium, Eisen, Kalium, Magnesium und Mangan als aus dem Gestein in relevanter Weise herausgelöste Elemente nachgewiesen, andere Elemente oft nur in Spuren [81-85]. Die in den hier durchgeführten Experimenten gemessenen Zink- und Bariumkonzentrationen in den Eluaten bewegen sich im Bereich zwischen 0,1-1 µmol/kg Granit (Abb.26) und können unter anderem auch durch chemische Kontaminationen aufgrund der verwendeten Materialien verursacht worden sein. Die meisten Gläser enthalten Metalle in geringen Konzentrationen, welche in die entsprechenden Lösungen gelangen können; für Zink wurden z.B. solche

Kontaminationen in Glas-, aber auch in Plastik-Laborgefäßen und -gegenständen nachgewiesen [225]. Diese Gefahr der Kontamination bestand natürlich aufgrund der verwendeten Glassäulen für viele Elemente, allerdings kann sie aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen für Zink und Barium eine deutlich größere Relevanz besitzen. Die Mangankonzentrationen (Abb.25) sind zwar auch vergleichsweise niedrig, allerdings spricht hier der deutliche Unterschied zwischen biotischen und abiotischen Proben gegen eine allgemeine chemische Kontamination durch die verwendeten Laborgegenstände oder -lösungen.

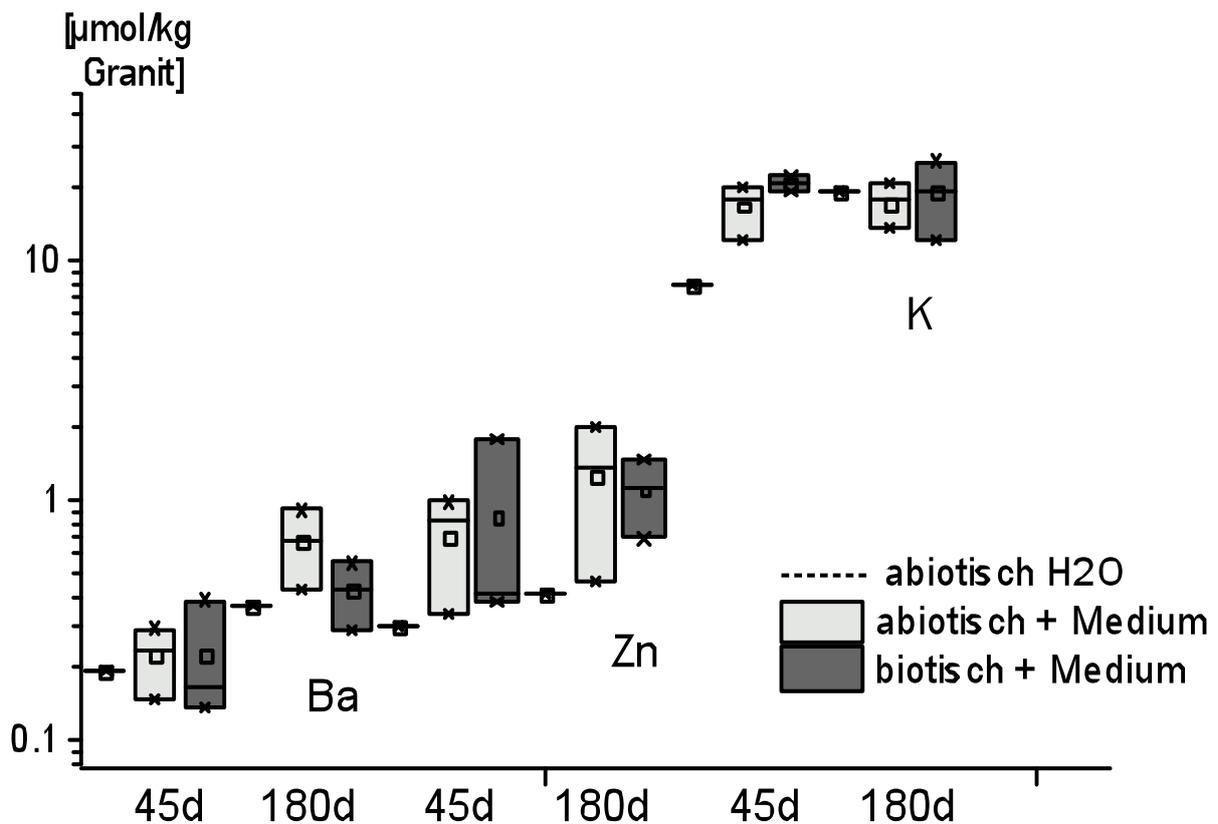


Abb.26: Per ICP-MS/OES gemessene Elementkonzentrationen in den Eluaten der Durchfluss-Experimente zur Granitverwitterung (Methodik beschrieben in 2.2.5.1) nach 45 und 180 d Inkubation für die Elemente Ba, Zn und K in einer Boxplot-Darstellung (n=3 für biotische und abiotische Proben mit Medium, n=1 für abiotische Proben mit Wasser). Es ist kein Unterschied bzgl. der Konzentrationen zwischen biotischen und abiotischen Proben erkennbar.

Da die Mikroorganismen die Elemente nicht nur aus dem Gestein lösen, sondern auch aufnehmen können, besteht eine weitere mögliche Einflussnahme auf die Eluatzusammensetzung. Eine Zellaufnahme von gelösten Elementen aus der flüssigen Phase entnimmt letztere dem Kreislauf und setzt ihre gemessene Eluatkonzentration herab, ein Absterben der Zellen kann zu einem Freisetzen von Elementen führen und deren

Eluatkonzentration ansteigen lassen. Studien an *N. flagelliforme* zeigen, dass z.B. Calcium bis zu 1,83% der Zellmasse ausmachen kann [226], Studien an Ascomyceten zeigen ähnliche Werte [227]. Bei genügend hohen Zellmassen kann also die Elementaufnahme in die Zellen zu entscheidenden Änderungen in deren Eluatkonzentrationen führen. Gleichzeitig kann so das Inokulum Elemente in das Experiment einbringen, die im Gestein und in der Nährlösung nicht vorhanden sind. Erstgenannte Änderungen können biotische Effekte der Elementauflösung verdecken, letztgenannte können solche biotischen Effekte vortäuschen.

Das Inokulum betrug  $7 \cdot 10^7$  Zellen pro Säule für jeden der beiden Mikroorganismen, was jeweils etwa  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro g Gestein entspricht. Nur das Inokulum kann vorher nicht im System vorhandene Elemente einbringen, die später in die wachsende Population inkorporierten Elemente müssen hingegen aus dem Gestein oder der Nährlösung (Millipore-Wasser mit Glucose und Thiaminhydrochlorid) stammen. Um mögliche vorgetäuschte biotische Auflösungseffekte durch abgestorbene Zellen des Inokulums, welche Elemente freisetzen, ermessen zu können, bedarf es einer Abschätzung der Zellmasse des Inokulums. Zur Abschätzung der Zellmasse aus der bekannten Zellzahl des Inokulums lassen sich entweder vorherige experimentelle Biomassendaten oder theoretische Berechnungen anwenden. Flüssigkulturen wurden parallel bzgl. der Trockengewichte und bzgl. des Chlorophyll a Gehalts für *N. punctiforme* bzw. bzgl. per Neubauer Zählkammer ausgezählter Zellzahlen für *K. petricola* analysiert. Bei einer Herunterskalierung ergeben sich Gewichtswerte von etwa 6 pg pro Zelle für *N. punctiforme* und von 0,22 ng für *K. petricola*. Hochgerechnet auf das Inokulum wären dies Werte von respektive 0,4 und 15 mg Biomasse pro Säule. Unter vereinfachenden Annahmen bzgl. der Dichte lassen sich aufgrund der Zellvolumina von Mikroorganismen deren Gewichte abschätzen [228]. Für *Escherichia coli* wurden so Werte von 1 pg pro Zelle, für *Saccharomyces cerevisiae* von 60 pg pro Zelle berechnet. Die gegenüber *E. coli* deutlich höheren Werte von *N. punctiforme* ließen sich unter anderem durch die größeren Zellen, die gegenüber *S. cerevisiae* höheren Werte von *K. petricola* durch die größeren Zellen und die massiveren Zellwände mit Melanineinlagerungen erklären und erscheinen daher plausibel.

Betrachtet man nun die prozentualen Elementkompositionen aus einer Studie für *N. flagelliforme* und wendet sie auf *N. punctiforme* an, so würden sich aufgrund der abgeschätzten Zellmasse Elementmengen von 0,21  $\mu\text{mol}$  Calcium, 0,06  $\mu\text{mol}$  Magnesium, 0,09 nmol Zink und 0,18 nmol Mangan ergeben, welche nur von den *N. punctiforme*-Zellen aus dem Inokulum abgegeben werden könnten [226]. Zieht man Werte von *Penicillium atrovenerum* zu Rate [227], um mögliche Elementkompositionen von Pilzen abschätzen zu können, so ergeben sich bei Anwendung auf *K. petricola* Werte von etwa 5,5  $\mu\text{mol}$  Calcium und 3,3  $\mu\text{mol}$  Magnesium für die dort in relevanter Größenordnung nachgewiesenen

Elemente. Diese so zusammengerechneten Elementmengen, die von zwei solchen Organismen bei entsprechend abgeschätzter Biomasse abgegeben werden können, liegen weit unter den im Eluat gemessenen (Abb.25, 26) und sprechen daher dafür, dass der entscheidende Anteil der Elemente im Eluat in den biotischen Proben nicht durch das Inokulum bereit gestellt wurde.

Nach Ablauf des Experimentes wurden die Zellzahläquivalente molekularbiologisch per qPCR und mikrobiologisch über eine Lebendzellzahlbestimmung für *K. petricola* bzw. über eine Bestimmung des Chlorophyll a Gehalts für *N. punctiforme* bestimmt (Methodik dazu in 2.2.1 beschrieben). Die Ergebnisse zeigen, dass für beide Organismen über die 180 d in den Durchfluss-Säulen Wachstum dokumentiert werden konnte (Abb.27). Für die abiotischen Säulen wurden mikrobiologische Analysen durchgeführt, die ergaben, dass keine Kontamination vorlag. Für Replikate innerhalb jeder Säule und zwischen den Triplikaten schwankten die ermittelten Zellzahlen, bewegten sich jedoch meist in der gleichen Größenordnung. Chlorophyll a Bestimmung und molekularbiologische Daten stimmten für *N. punctiforme* überein, für *K. petricola* wurden per Lebendzellzahlbestimmung deutlich weniger Zellen ermittelt als über die qPCR. Da mit den molekularbiologischen Methoden der gesamte auf dem Gestein vorkommende DNA-Gehalt ermittelt wird, werden auch abgestorbene Zellen berücksichtigt. Das Vorhandensein abgestorbener Zellen nach Abbruch des Experimentes bedeutet allerdings nicht, dass diese Zellen während der 180 d Inkubation keinen Einfluss auf die Auflösung von Elementen aus dem Gestein gehabt haben können.

Zieht man die vorher erwähnten Gewichtsabschätzungen pro Zelle zu Rate, ergibt sich für die finalen Zellzahlen eine Biomasse von etwa 0,5 g pro Säule.

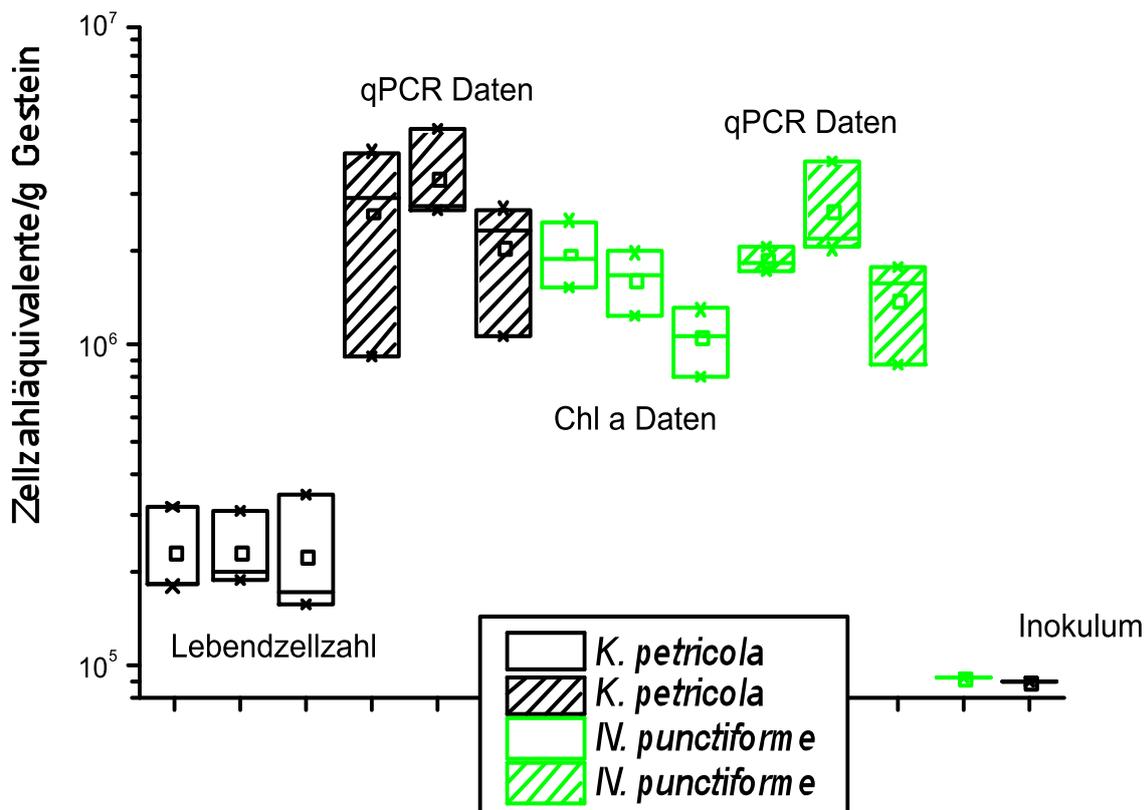


Abb.27: Ermittelte Abundanzen für *K. petricola* (in schwarz) und *N. punctiforme* (in grün) nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Experimenten zur Granitverwitterung (Methodik beschrieben in 2.2.5.1). Ein Boxplot zeigt 3 Werte innerhalb einer Säule an, jeder Boxplot repräsentiert jeweils die Werte einer der Säulen, die mit Mikroorganismen inkubiert wurden. Molekular- und mikrobiologische Methoden wurden zur Ermittlung der Abundanzen angewendet. Für *N. punctiforme* stimmen die Werte der qPCR-Daten und der Bestimmung des Chlorophyll a Gehalts überein, für *K. petricola* sind die Werte der Lebendzellzahlbestimmung gegenüber den molekularbiologisch ermittelten Daten niedriger.

Von allen Elementen, die in Konzentrationen von  $>2 \mu\text{mol/kg}$  Granit im Eluat gemessen wurden, lagen nur für Kalium keine Unterschiede zwischen biotischen und abiotischen Proben im Eluat vor (Abb.26); ob der fehlende Unterschied hier unter anderem auf eine Aufnahme von Kalium in die Zellen zurückzuführen ist, lässt sich aufgrund der Resultate nicht eruieren. Es ist bekannt, dass der Kaliumgehalt in unterschiedlichen Mykorrhizapilzen stark variieren kann, was auf die unterschiedliche Fähigkeit zur Kaliumakkumulation zurückzuführen ist [229, 230]. Studien an *N. flagelliforme* und *P. atrovenetum* zeigten allerdings keine signifikanten Kaliumgehalte in den Zellen [226, 227]. In Mikroorganismen spielt Kalium als hauptsächliches intrazelluläres Kation eine besondere Rolle bei der Anpassung an osmotischen Stress bzw. im Umgang mit Veränderungen der Osmolarität [231]. Es ist daher anzunehmen, dass es wenigstens in Spuren immer auch in Organismen

vorhanden ist. Dass Kalium aus Granit von Pilzen verstärkt herausgelöst werden kann, wurde von Brunner et al. 2011 gezeigt [82]. Eine Aufnahme von Kalium in die Zellen von *K. petricola* und *N. punctiforme*, welche biotische Auflösungseffekte vollständig verdeckte, müsste sich mindestens im Größenbereich von 5-10  $\mu\text{mol}$ , also 200-400  $\mu\text{g}$ , bewegen (Abb.26). Bei der abgeschätzten Biomasse von etwa 0,5 g entspräche dies prozentualen Anteilen in den Zellen, die zumindest für Mykorrhizapilze gezeigt wurden und von diesen sogar deutlich überschritten werden können [229, 230].

Die Elemente Calcium, Natrium, Magnesium und Mangan wurden in den biotischen Proben in signifikant höheren Konzentrationen in den Eluaten gemessen (Abb.25). Sowohl in den biotischen als auch in den abiotischen Proben wies dabei Calcium die höchsten Konzentrationen auf, gefolgt von Natrium; beide Elemente stammen wahrscheinlich zu einem großen Teil aus dem Albit-ähnlichen Plagioklas. Die Konzentrationen von Magnesium und Mangan lagen eine Größenordnung niedriger; diese Elemente wurden wahrscheinlich aus dem 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. Der Granit wird vom Plagioklas, vom Kaliumreichen Feldspat und von Quarz bzgl. seiner Zusammensetzung dominiert; Glimmer wie Biotit kommen allerdings auch in relevanten Mengen vor. Typische chemische Auflöseraten von Quarz sind deutlich niedriger als die von Glimmern wie z.B. Muskovit; letztere wiederum unterschreiten die Auflöseraten von Feldspäten [214]. Unter den Feldspäten besitzt Albit verglichen mit Mikroklin die höheren Auflöseraten [214]. Plagioklas wird daher normalerweise vor Mikroklin und Biotit aus Graniten im Verlauf chemischer Verwitterung herausgelöst [64]. Im vorliegenden Granit ist daher in Anbetracht seiner mineralogischen Zusammensetzung zu erwarten, dass zuerst Natrium und Calcium herausgelöst werden, Kalium aus Mikroklin und Biotit sowie Mangan und Magnesium aus Biotit hingegen erst in späteren Stadien.

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 [17-20, 72, 73]. Es können von einigen Organismen zwar auch gezielt Elemente katalytisch mobilisiert werden [25], diese Mechanismen sind allerdings sehr spezifischer Natur und bisher nur für einige spezialisierte Bakterien- und Archaeengruppen beschrieben worden. Essenzielle Elemente erhöhen allerdings die Vitalität der Mikroorganismen und können so die Auflösung von Mineralen derart beeinflussen, dass an den Stellen, wo sie vorhanden sind, das mikrobielle Wachstum verstärkt werden kann. Natrium, Magnesium und Calcium gehören zu

den häufigsten Metallen, welche in der belebten Natur vorkommen [232]. Magnesium-abhängige Enzyme kommen in allen Organismen bei generellen metabolischen und entscheidenden Nukleotid umsetzenden Reaktionen vor [233]; Magnesium ist daher zumindest in geringen Konzentrationen für alle Organismen absolut notwendig und wird auch ubiquitär in den Elementkompositionen der belebten Umwelt gefunden [234], ebenso wie speziell in Cyanobakterien und Ascomyceten [226, 227]. Dies trifft auch auf Calcium zu, dessen Rolle in der Biologie bereits vorher thematisiert wurde (siehe 3.2, [217, 218]). Mangan spielt ähnlich wie Magnesium als Co-Faktor in Enzymen eine Rolle [235], ist allerdings in Organismen weniger verbreitet und kommt dort meist in vergleichsweise niedrigeren Konzentrationen vor [226, 227, 234]. Natrium fungiert ähnlich wie auch Kalium als eines der Hauptelektrolyte der Zellen, um elektrochemische Gradienten aufrechterhalten und zur Ladungsneutralisierung beitragen zu können [236].

Die Selektion essenzieller Elemente zur Akkumulation seitens der Mikroorganismen erfolgt aber meist sekundär [234], 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 Calcium- 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 Calcium, Natrium, Magnesium und Mangan in den biotischen Proben demonstrieren, dass die Verwitterung durch die Anwesenheit der Mikroorganismen verstärkt wurde.

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. Solche Unterschiede konnten auch beobachtet werden. In Anschliffen des Granits mit beiden Feldspat-Typen wurde zentral und in der Nähe der Grenzfläche die chemische Zusammensetzung per EDS gemessen (Abb.28).

Für den Plagioklas wurde eine Grenzflächen-nahe Auflösung von Calcium beobachtet (Abb.29). Präparate des Zustandes vor dem Verwitterungsexperiment zeigten nahezu deckungsgleiche Spektren, wenn man EDS-Analysen von zentralen Messpunkten über solche von Grenzflächen-nahen Messpunkten legte (Abb.29 oben). Präparate des Zustandes

nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Säulen zeigten hingegen Unterschiede in der Calciumkonzentration; während zentral im Gesteinskorn geringe Mengen an Calcium vorhanden sind, fehlt es an der Oberfläche fast vollständig (Abb.29 unten). 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-Analysen sowohl für biotische als auch für abiotische Proben gezeigt (Abb.25), die Werte lagen allerdings deutlich unter denen für Calcium. Es wurde in Studien zur chemischen Verwitterung von Plagioklasen gezeigt, dass die Auflöseraten mit zunehmendem Anorthit- und damit Calciumgehalt steigen [237, 238]. Es erscheint daher plausibel, dass Calcium aus Plagioklasen schneller herausgelöst wird als Natrium und daher in verhältnismäßig höheren Konzentrationen im Eluat vorliegt, auch wenn der prozentuale Anteil im Mineral relativ deutlich niedriger ist. Die schnellere Freisetzung von Calcium 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.

Für den Mikroklin-ähnlichen Feldspat wurde eine Grenzflächen-nahe Auflösung von Natrium beobachtet. Auch hier waren die übereinandergelegten Spektren für zentrale und oberflächennahe Bereiche für den Zustand vor dem Verwitterungsexperiment nahezu deckungsgleich, während sich für den Zustand nach der Inkubation in den Durchfluss-Säulen eine fast vollständige Auflösung der geringen Natriummengen innerhalb des Feldspats an der Oberfläche zeigte. Geringe Natriummengen im Mikroklin-ähnlichen Feldspat wurden in den Dünnschliffen für die Mikrosondenanalyse nachgewiesen (Abb.23), Mikroklin besitzt allerdings die Verhältnisformel  $K(AlSi_3O_8)$ . Die geringen Natriummengen lassen sich jedoch durch zahlreiche kleine Einschlüsse erklären, die eine dem Albit ähnliche Zusammensetzung aufweisen. Diese Einschlüsse erscheinen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme im helleren Bereich des Kalifeldspats ähnlich dunkel wie der Plagioklasbereich (Abb.28). Natrium besitzt im Vergleich zu Kalium bei der Verwitterung von Graniten eine höhere relative Mobilität, d.h. es geht mit einer höheren Rate vom Ausgangsgestein in die Umgebung [102]. Dies stimmt mit höheren Auflöseraten von Albit gegenüber Mikroklin überein [214]. Kleine Albit-ähnliche Einschlüsse innerhalb der Mikroklin-ähnlichen Phase können somit aufgrund ihres Natriumgehalts auch schneller gelöst werden als der Kalifeldspat, was in einer primären Natriumauflösung resultieren und die beobachtete oberflächennahe Natriumverarmung nach der Inkubation in den Durchfluss-Säulen erklären würde. Die gegenüber dem Gesteinszentrum unveränderten Kaliumwerte an der Oberfläche können einerseits daran liegen, dass Kalium in den untersuchten Anschliffpräparaten nicht aus dem Mikroklin gelöst wurde; andererseits kann es auch nur in unmittelbarer Nähe zur

Oberfläche aus dem Gestein gelöst worden sein, sodass es unter der räumlichen Auflösungsgrenze des REM-Mikroskops liegt und nicht nachweisbar ist. Die per ICP-MS/OES gemessenen Kaliumwerte im Eluat (Abb.26) sprechen für letztere Möglichkeit.

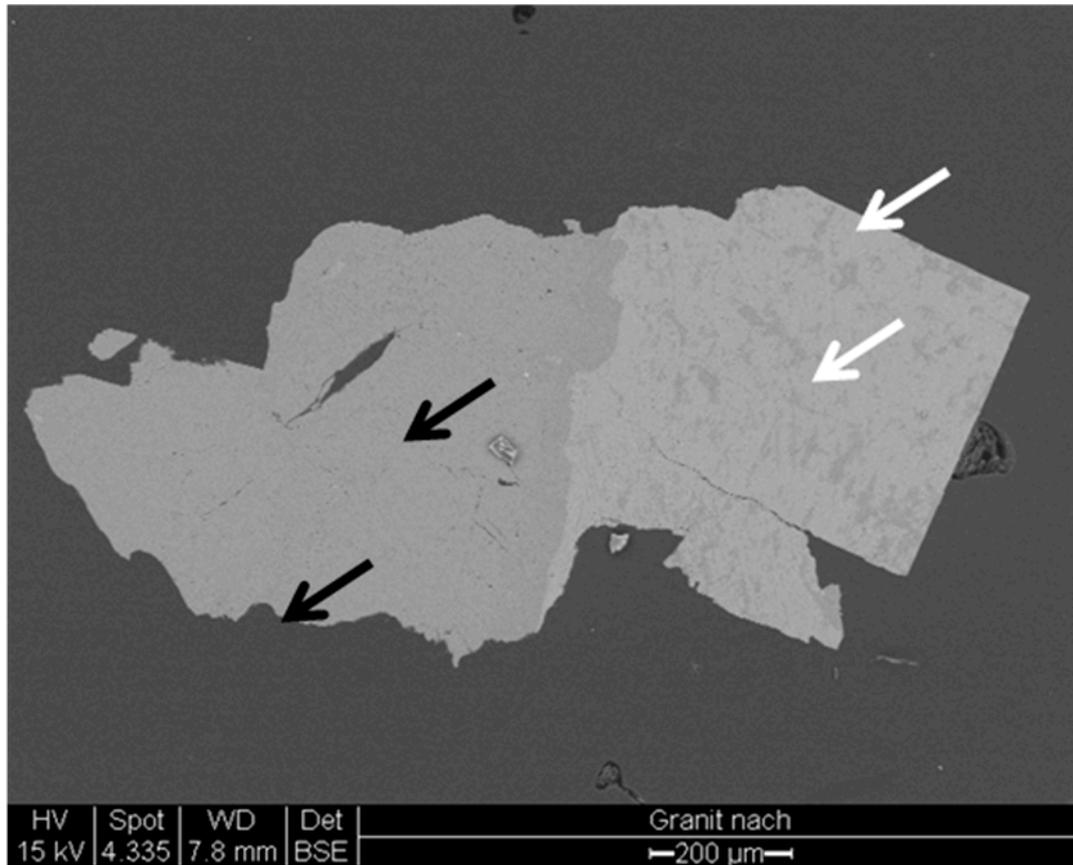


Abb.28: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Anschliffpräparats von Granit nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Experimenten zur Granitverwitterung (Methodik beschrieben in 2.2.5.1). Nur die äußere Umrandung des Anschliffs war im Experiment der Verwitterung ausgesetzt. Es sind beide Feldspat-Typen zu erkennen, links der dunkler erscheinende Albit-ähnliche Plagioklas, rechts der heller erscheinende Mikroklin-ähnliche Feldspat. Für beide Feldspat-Typen wurden zentral und nahe der Oberfläche EDS-Messungen durchgeführt (markiert durch schwarze Pfeile für den Plagioklas und weiße Pfeile für den Kalifeldspat).

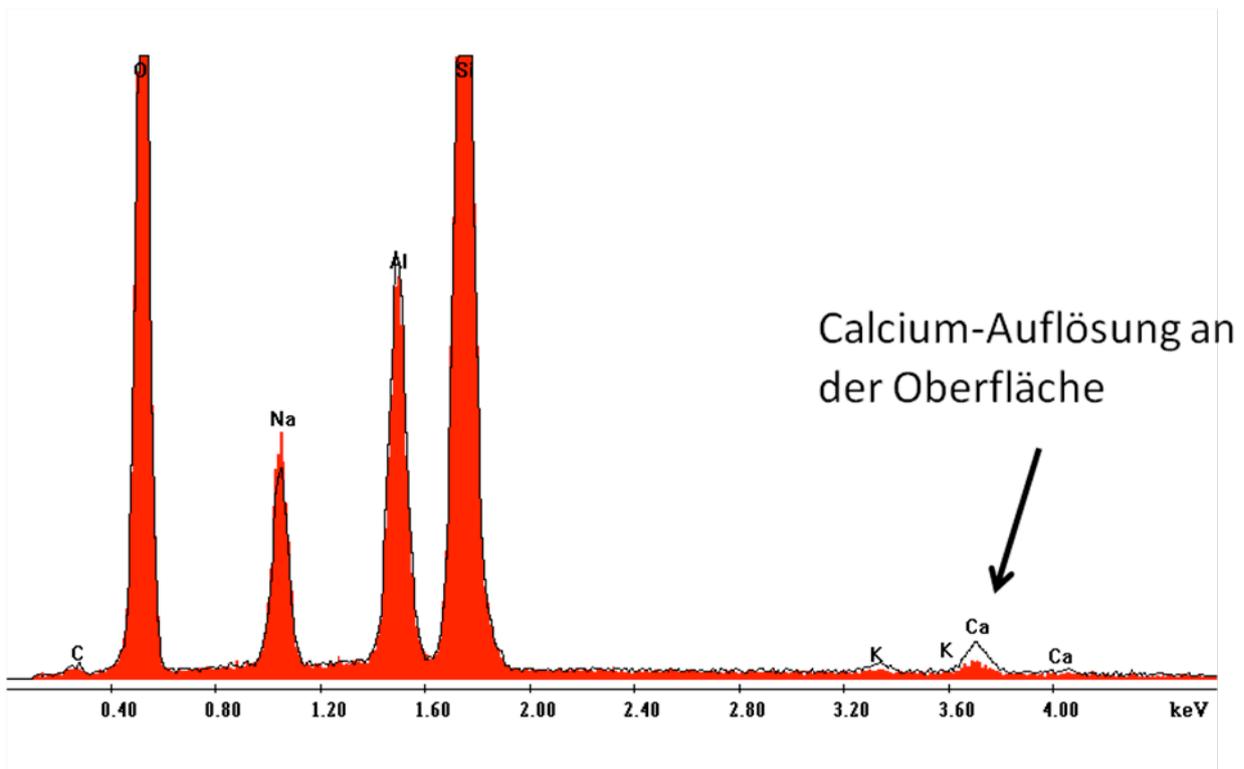
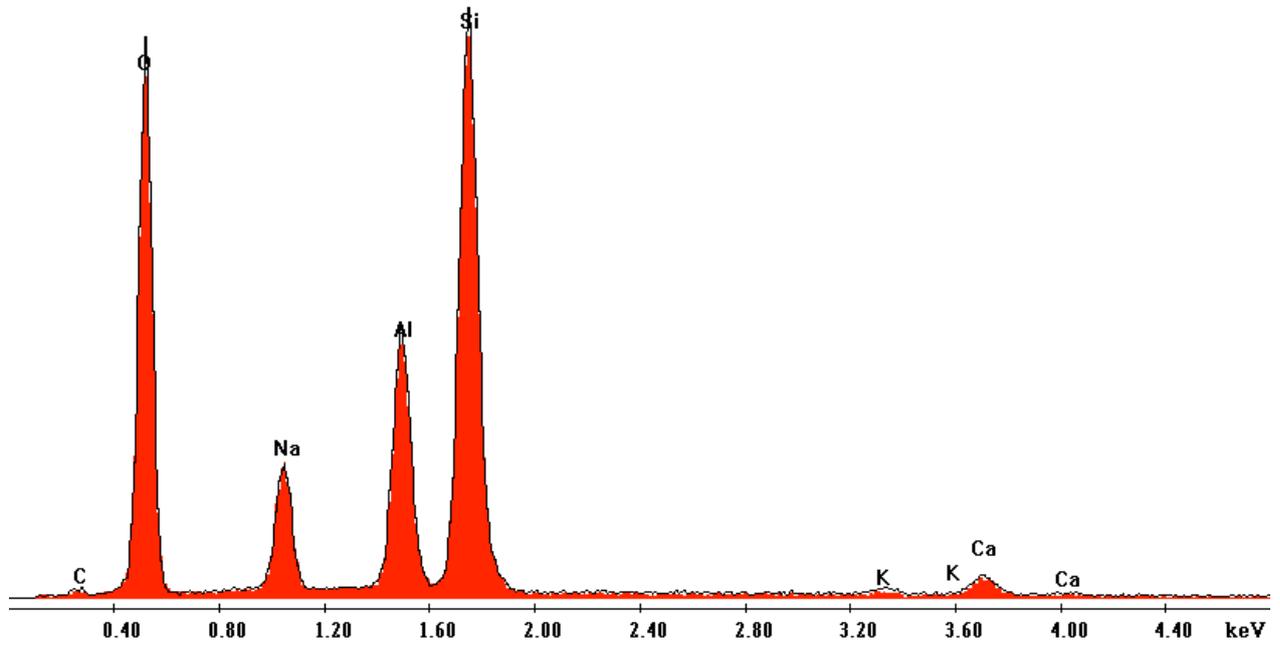


Abb.29: EDS-Spektren für den Albit-ähnlichen Plagioklas vor (oben) und nach (unten) 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Experimenten zur Granitverwitterung. Es handelt sich jeweils um eine Überlagerung der Spektren für den zentralen Zustand (schwarze Umrandung) und für den Grenzflächen-nahen Zustand (rote Füllung). Oben: Vor dem Experiment sind beide Zustände nahezu deckungsgleich. Unten: Nach 180 d Inkubation im Verwitterungsexperiment zeigt sich eine Calcium-Auflösung an der Oberfläche (markiert durch einen Pfeil).

Die Berechnung der Verwitterungsindices WIP und CIA nach [200], entsprechend der Gleichungen (3) und (4) (beschrieben in 1.1.1), ergab die in Tab.8 gezeigten Werte.

Tab.8: Berechnete Verwitterungsindices CIA und WIP nach den Gleichungen (3) und (4) (beschrieben in 1.1.1). CIA-Werte steigen und WIP-Werte sinken mit zunehmendem Verwitterungsgrad.

<b>Probe</b>	<b>CIA-Index</b>	<b>WIP-Index</b>
Ausgangszustand	20,6	4440
abiotische Kontrolle mit Millipore-Wasser	24,0	4310
abiotische Probe mit Medium 1	26,9	4106
abiotische Probe mit Medium 2	23,6	4020
abiotische Probe mit Medium 3	45,9	4130
biotische Probe mit Medium 1	25,9	4257
biotische Probe mit Medium 2	47,4	3904
biotische Probe mit Medium 3	44,9	4320

Die CIA-Werte steigen mit zunehmendem Verwitterungsgrad. Der Ausgangszustand zeigt erwartungsgemäß den niedrigsten Wert, alle anderen Werte liegen höher. Die biotischen Proben haben im Mittel höhere Werte als die abiotischen, allerdings weichen einzelne Werte ab. Der CIA-Index-Wert für die abiotische Probe 3 mit Medium ähnelt den Werten für die biotischen Proben 2 und 3, während der Wert für die biotische Probe 1 den Werten der anderen abiotischen Proben ähnelt (Tab.8). Der Wert für die abiotische Kontrollprobe mit Millipore-Wasser liegt höher als der Ausgangszustand aber unter den Werten für die meisten anderen Proben.

Die WIP-Werte sinken mit zunehmendem Verwitterungsgrad. Der Ausgangszustand zeigt hier erwartungsgemäß den höchsten Wert. Die biotischen Proben haben im Mittel höhere Werte als die abiotischen, allerdings weichen einzelne Werte ab. Der WIP-Index-Wert für die biotische Probe 2 liegt unter den Werten für die abiotischen Proben, während die Werte für die anderen biotischen Proben darüber liegen (Tab.8). Der Wert für die abiotische Kontrollprobe mit Millipore-Wasser liegt niedriger als der Ausgangszustand aber höher als die Werte für die meisten anderen Proben.

Die Daten der Verwitterungsindices zeigen also generell, dass nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Säulen die Verwitterung höher ist als vorher. Eine Inkubation mit Millipore-Wasser führt zu niedrigeren Verwitterungsgraden als eine Inkubation mit Verwitterungsmedium 1. Die CIA-Index-Werte sprechen dafür, dass die Anwesenheit von Mikroorganismen tendenziell die Verwitterung verstärkt, während die WIP-Index-Werte im Mittel einen höheren Verwitterungsgrad für abiotische Proben zeigen (Tab.8). Da die Werte generell stark schwanken, lassen sich aus den vorhandenen Daten zur Berechnung der Verwitterungsindices keine Aussagen über Unterschiede zwischen biotischer und abiotischer Verwitterung ableiten.

Der pH-Wert änderte sich im Verlauf des Experiments nicht signifikant. Für den Zustand vor dem Experiment wurde für die Proben mit Verwitterungsmedium 1 und Granit ein pH-Wert von 5,6 gemessen. Nach der Inkubation in den Durchfluss-Säulen lag der pH-Wert für die biotischen und die abiotischen Proben mit Verwitterungsmedium 1 zwischen 5,5 und 5,6. Es handelt sich dabei allerdings um den in Lösung gemessenen pH-Wert. Direkt in unmittelbarer Umgebung von mikrobiellen Kolonien und an den Grenzflächen zwischen Mikroorganismen und Gesteinen können die pH-Werte sich deutlich von denen unterscheiden, die man in makroskopischer Entfernung zu den Kolonien z.B. in einer diese umgebenden Lösung misst [239-241]. Für Cyanobakterien wurde z.B. gezeigt, dass diese unabhängig von den pH-Werten der umgebenden Flüssigkeit die pH-Werte an der Oberfläche von Biofilmen regeln können; so kann der pH-Wert je nachdem, ob Licht vorhanden ist oder nicht, deutlich verändert werden [240]. Durch die Schaffung solcher Mikroumgebungen in unmittelbarer Nähe zu den Zellen können so physikochemische Bedingungen hergestellt werden, welche vorteilhafter für die Mikroorganismen sind [241]. An der Grenzfläche zwischen mikrobiellen Kolonien und Gestein kann es zu einer Konzentrierung ausgeschiedener Stoffwechselprodukte kommen [25], was zu signifikanten Veränderungen des pH-Wertes führen kann [239]. Für die Messung dieser pH-Werte benötigt man Mikroelektroden; zudem ist sie, um vertrauenswürdige Werte zu erhalten, mit hohem technischem Aufwand verbunden. Eine solche Messung der Mikroumgebung von den Kolonien müsste *in situ* (im Fall der verwendeten Glas-Säulen also auch *in vitro*) durchgeführt werden, da die Abnahme der umgebenden Flüssigkeit die Mikroumgebung stark beeinflussen kann und eine pH-Messung dann nicht mehr den Zustand während des Experiments widerspiegeln würde.

Zusammenfassend kann also für die Experimente an Granit festgestellt werden, dass die Elemente Mangan, Magnesium, Natrium und Calcium stärker in den biotischen als in den abiotischen Proben im Eluat vorlagen (Abb.25), was nicht auf die Inhaltsstoffe des Inokulums zurückgeführt werden kann. Die Elemente Barium, Zink und Kalium wurden für biotische und abiotische Proben in gleichen Mengen gemessen. Eine oberflächennahe Calciumverarmung

im Plagioklas und eine entsprechende Natriumverarmung im Kalifeldspat konnten per REM-EDS-Analysen beobachtet werden (teilweise gezeigt in Abb.29). Nach dem Experiment konnte in den biotischen Proben mikrobielles Wachstum verzeichnet werden (Abb.27), in den abiotischen Proben hingegen nicht. Der pH-Wert in der Lösung veränderte sich im Verlauf des Experiments nicht signifikant. Berechnungen der Verwitterungsindices WIP und CIA zeigten, dass der Verwitterungsgrad im Vergleich zum Ausgangszustand zunahm, Unterschiede zwischen biotischen und abiotischen Proben lassen sich für die hier vorliegenden Daten jedoch nicht daraus ableiten (Tab.8).

### **Verwitterung von Albit und Mikroklin**

Weiterführende Experimente zur Verwitterung wurden ebenfalls in den Durchfluss-Säulen jeweils mit einem Albit und einem Mikroklin über den gleichen Zeitraum durchgeführt (Methodik beschrieben in 2.2.5.1), allerdings nicht als Triplikat. Die Minerale wurden beim Rheinischen Mineralienkontor bestellt (siehe 2.1.1.2).

Beide Minerale wirkten relativ homogen, einzelne Mineralkörner wurden mineralogisch untersucht. REM-EDS-Analysen solcher Mineralkörner ergaben für den Albit, dass er zu einem großen Teil aus einer Phase bestand, die der Albit-Idealformel  $\text{Na}_{1,0-0,9}\text{Ca}_{0,0-0,1}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$  sehr nahe kam (Abb.30). Dabei wurden auch geringe Calciummengen gemessen, ähnlich wie das auch für den Albit-ähnlichen Plagioklas im Granit der Fall war (Abb.24, 29). Vereinzelt Einschlusskörper zeigten allerdings eine chemische Zusammensetzung, die eher einem Mikroklin ähnelt (Abb.30). Für den Mikroklin hingegen zeigte sich bei REM-EDS-Analysen, dass er zumindest im Fall der untersuchten Mineralkörner zu etwa gleichen Teilen aus einer Natrium-reichen, Albit-ähnlichen Phase und einer Kalium-reichen Phase bestand (Abb.31), wobei letztere von der chemischen Zusammensetzung der Mikroklin-Idealformel  $\text{K}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$  sehr nahe kam. Mikrosondenanalysen zeigten, dass die Albit-ähnliche Phase etwa 20-25% des Mikroklin ausmachte und ebenfalls geringe Mengen Calciums enthielt.

Generell ist das Vorkommen von Kalifeldspat-Kristallen innerhalb von Plagioklas-Phasen nicht ungewöhnlich und wird im Zusammenhang von Metasomatosen diskutiert, bei welchen bestimmte Gesteinskomponenten durch andere ersetzt werden, in diesem Fall Natrium und Calcium durch Kalium [242]. Albit kann bei der Bildung von Mikroklin aus magmatischen Schmelzen als Entmischungsprodukt auftreten und wird auch oft als solches dort gefunden [243].

Nach Inkubation für 180 d in den Durchfluss-Säulen wurde für den Albit eine fast identische Situation beobachtet, wie für den Albit-ähnlichen Plagioklas innerhalb des Granits in Abb.29

dargestellt wurde, und zwar für biotische und für abiotische Proben (nicht gezeigt). Oberflächen-nah war in Querschnitten von Mineralkörnern im Vergleich zum Zentrum eine Calciumverarmung zu erkennen, die Natriumwerte hingegen zeigten in REM-EDS-Analysen keine erkennbaren Unterschiede. Die Calciumverarmung konnte direkt im Präparat anhand eines „Auslaugungsbands“ gesehen werden: Eine etwas dunklere Zone reichte teilweise von der Grenzfläche bis etwa 5-10 µm in das Präparat hinein. Von dort an bis ins Zentrum des Querschnittpräparats erschien das Mineral heller (Abb.32a). Die Helligkeit einzelner Areale in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nimmt mit zunehmender Ordnungszahl der dort vorkommenden Elemente zu; eine Auflösung von Elementen führt zu einer Abnahme der Gesamtordnungszahl im Präparat, was im Fall der oberflächennahen Auflösung von Calcium im Albit in dunkleren Randbereichen resultiert. Ein Strichrasterverfahren entlang einer Linie von der Grenzfläche zwischen Gestein und Umgebung bis zum Übergang von der dunkleren in die hellere Phase bestätigte die Calciumverarmung (Abb.32b): Bis zum Übergang in die hellere Phase sind die Calciumwerte niedrig und steigen direkt danach sprunghaft an; dies konnte für Natrium nicht beobachtet werden (Strichrasterbild nicht gezeigt). Eine Auflösung von Natrium wurde allerdings für die biotische und die abiotische Probe über ICP-MS/OES-Analysen im Eluat nachgewiesen, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration als Calcium (Abb.33). Kaliumverarmung hingegen wurde per REM-EDS-Analysen nicht und per ICP-MS/OES-Analysen in sehr geringen Mengen beobachtet. Der sprunghafte Anstieg der Calciumkonzentration im zentraleren Mineralbereich spricht dabei für einen Auflösungs-Reprazipitierungsmechanismus der vorliegenden Mineralverwitterung, wie von Hellmann et al. [244] beschrieben. Minerale werden demnach aufgelöst und können direkt an der Grenzfläche von Gestein und Umgebung reprazipitieren. Die auf dem ursprünglichen Gesteinsmaterial neu präzipitierte Schicht grenzt sich dabei von ersterem scharf ab und ist oft durchlässig für Flüssigkeiten. Oft äußert sich die Abgrenzung vom ursprünglichen Gestein auch in veränderten Konzentrationen beteiligter Elemente, wie im vorliegenden Fall für Calcium gezeigt. Calcium enthaltender Albit wurde demnach oberflächennah gelöst und reprazipitierte dann mit deutlich geringeren Calciumanteilen.

Für den Mikroklin wurde nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Säulen per ICP-MS/OES-Analysen die Auflösung von Natrium, Kalium und Calcium nachgewiesen (Abb.33). Natrium zeigte dabei die höchsten Konzentrationen im Eluat, gefolgt von Kalium und Calcium. Natrium und Calcium waren in den Eluaten der biotischen Proben höher konzentriert als in denen der abiotischen Proben, für Kalium wurde kein Unterschied zwischen beiden Proben festgestellt. Die Eluatkonzentrationen der Mikroklinproben lagen im Fall von Calcium zwei Zehnerpotenzen unter denen der Albitproben, bzgl. Natriums waren sie 5-10fach niedriger und bzgl. Kaliums leicht höher. Unterschiede zwischen oberflächennahen und zentralen Bereichen in Mineralkörnern konnten per REM-EDS für keines der Elemente gezeigt werden.

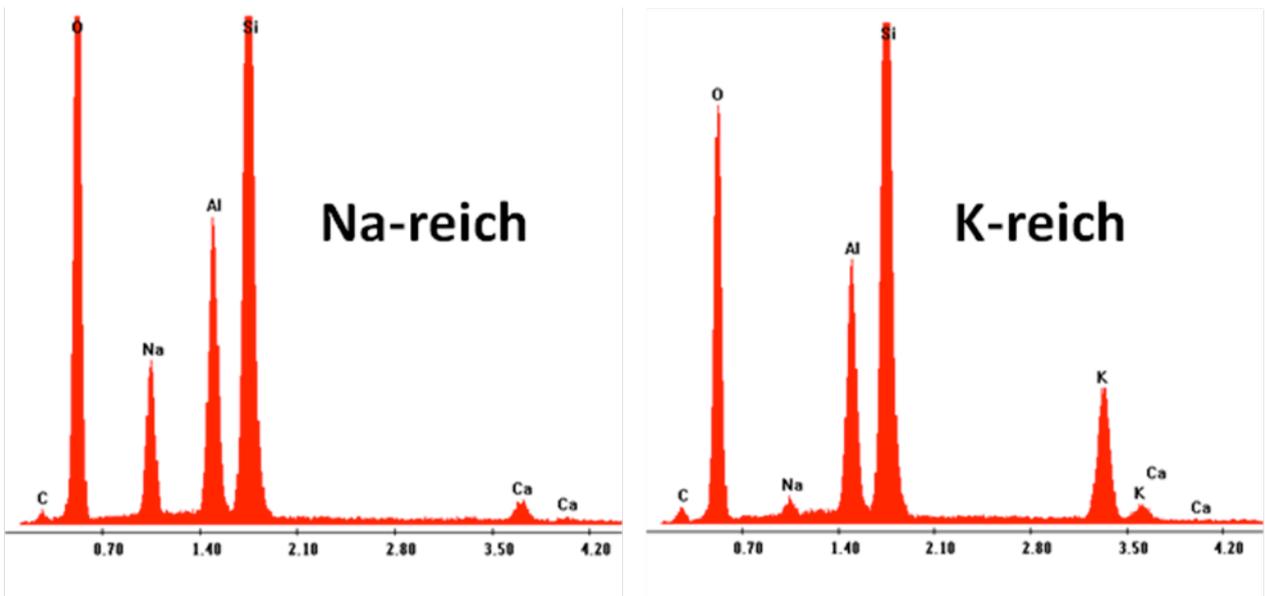
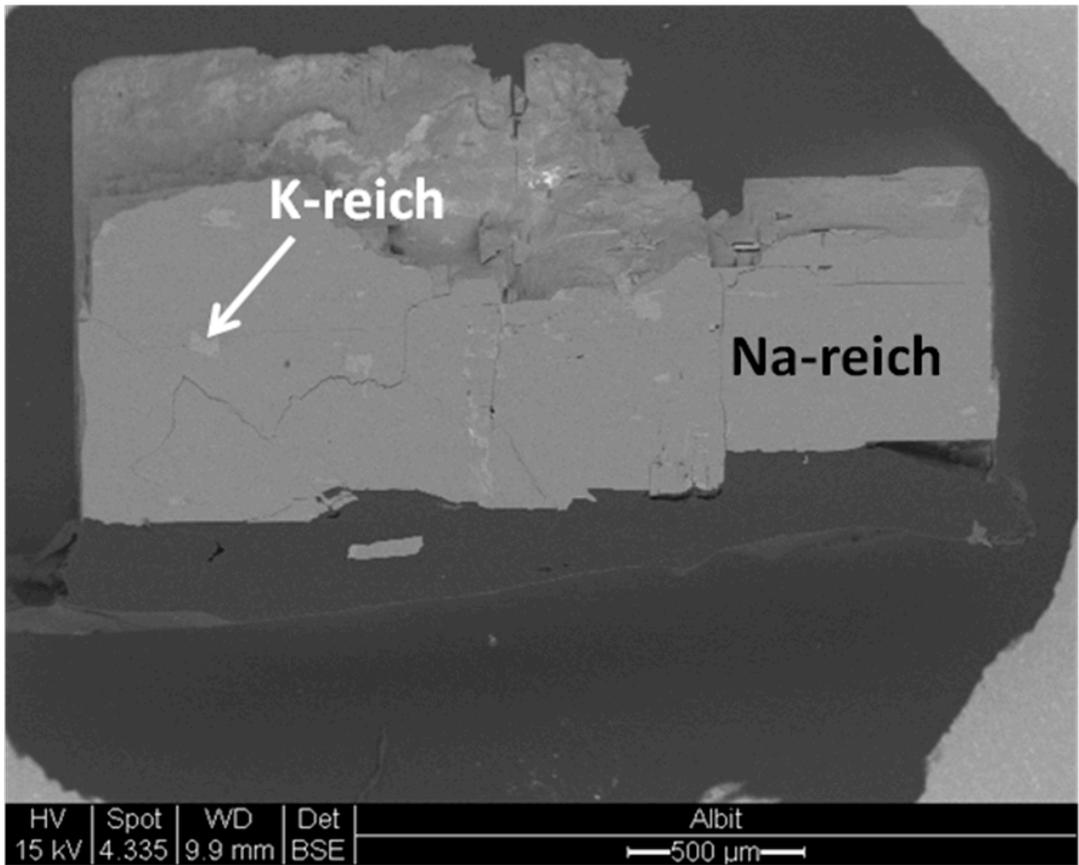


Abb.30: Oben: REM-Aufnahme eines Anschliffpräparats des verwendeten Albits. Es sind zwei mineralische Phasen erkennbar: eine dunklere Phase, welche den Großteil des Minerals ausmacht und der Idealformel von Albit sehr nahekommt, und eine hellere Phase, welche in Form vereinzelter Einschlüsse vorkommt (beispielhaft markiert durch einen weißen Pfeil) und von der Verhältnisformel her einem Mikroklin ähnelt. Die so erhaltene Verteilung wurde auf allen untersuchten Mineralkörnern (n=2) beobachtet. Unten: EDS-Messungen der dunkleren (links) und der helleren (rechts) Phase zeigen die Elementverhältnisse, welche Albit (links) und Mikroklin (rechts) ähneln.

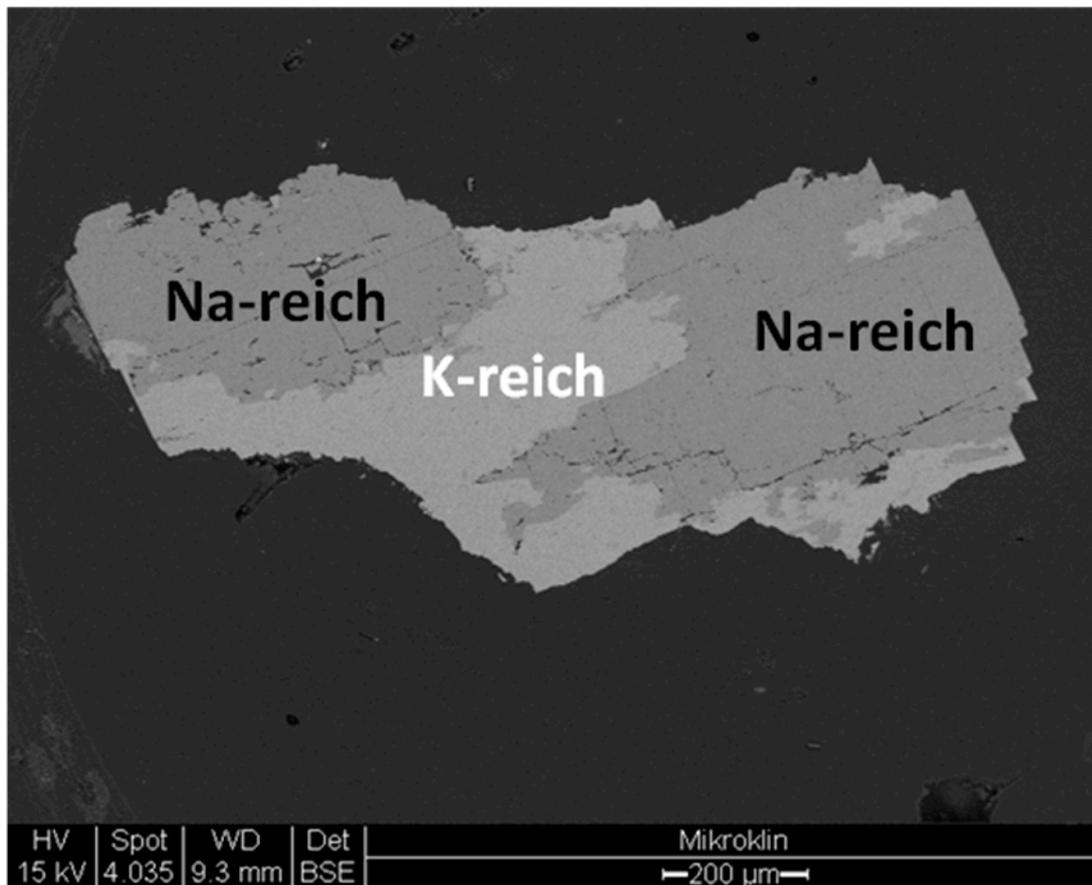


Abb.31: REM-Aufnahme eines Anschliffpräparats des verwendeten Mikroklin. Es sind zwei mineralische Phasen erkennbar: eine dunklere Phase, welche der Idealformel von Albit sehr nahekommt, und eine hellere Phase, welche von der chemischen Zusammensetzung der Idealformel von Mikroklin ähnelt; die erwähnten chemischen Zusammensetzungen wurden per EDS-Analyse gemessen (nicht gezeigt).

Die relativ höheren Natriumkonzentrationen im Eluat lassen sich mit dessen im Vergleich zu Kalium höheren relativen Mobilität und den damit verbundenen relativ höheren Auflöseraten von Albit gegenüber Mikroklin erklären [102, 214]. Die Albit-ähnliche Natrium-reiche Phase innerhalb des Mikroklin wird schneller aufgelöst als die Kalium-reiche Phase, weshalb die Natriumkonzentration nach 180 d höher ist. Im Mikroklin-ähnlichen Feldspat innerhalb des Granits wurden in REM-EDS-Analysen von Anschliffen Natrium- aber keine Kaliumverarmungen in der Nähe der Oberfläche im Vergleich zum Zentrum beobachtet. Dies bestätigt, dass auch in dem Fall zumindest mehr Natrium als Kalium aus dem Feldspat gelöst wurde, da die Natriumverarmung durch die Auflösung der REM-Technik gezeigt werden konnte und die Kaliumverarmung nicht. Calcium wurde wahrscheinlich aus der Albit-ähnlichen Phase des Mikroklin gelöst und liegt in einer niedrigeren Größenordnung im Eluat vor als für Albit oder die Albit-ähnliche Phase im Granit. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der relative Calciumanteil in den Albit-ähnlichen Phasen im Mikroklin unter dem aus Albit und Albit-ähnlicher Phase im Granit lag, was durch Mikrosondenanalysen ermittelt

wurde.

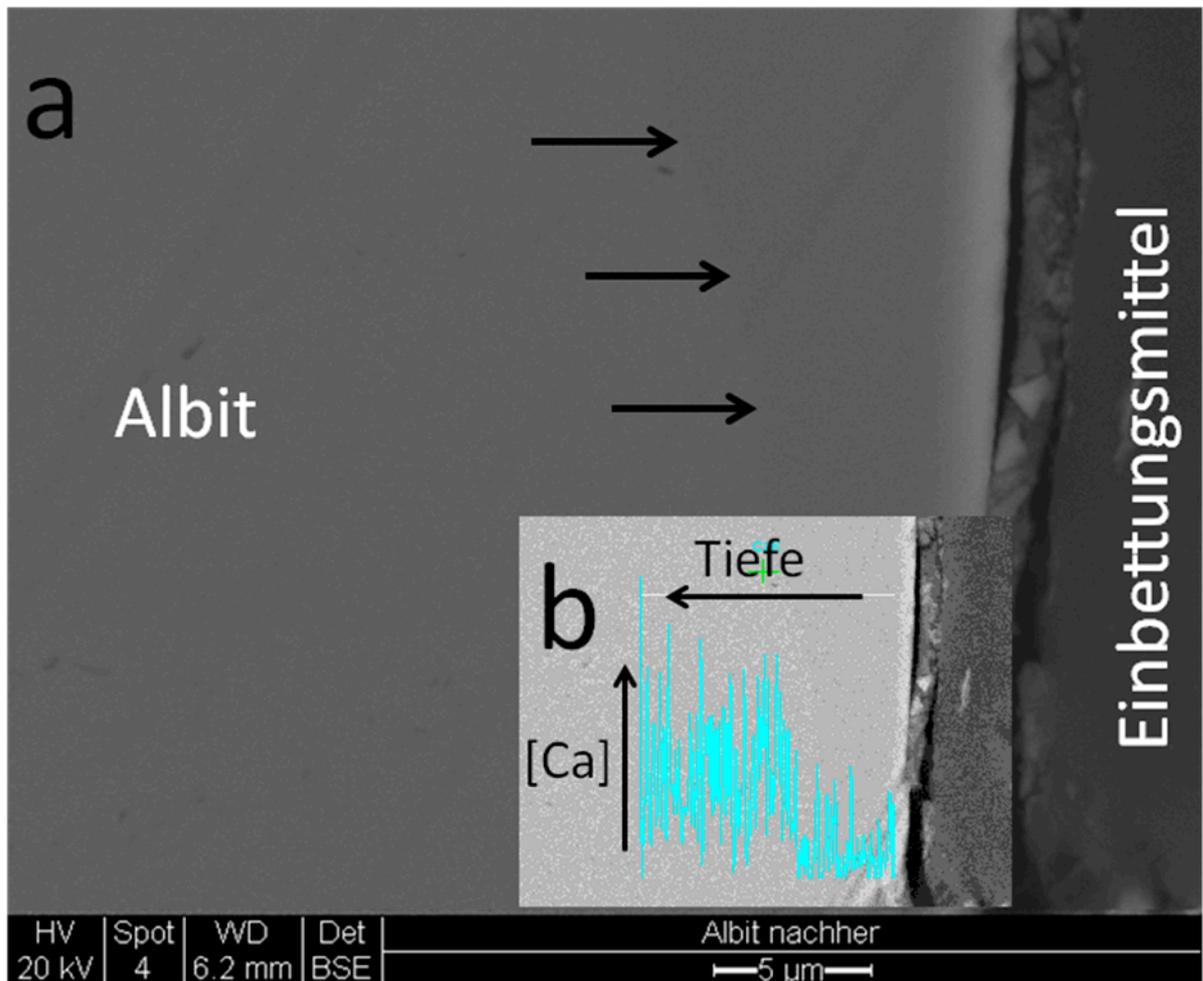


Abb.32: (a) REM-Aufnahme eines Anschliffpräparats des verwendeten Albits nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Experimenten zur Albitverwitterung. Es handelt sich dabei um die prozentual am weitesten vertretenen mineralischen Phase, welche der Idealformel von Albit sehr nahe kommt. Im Randbereich ist ein dunklerer Streifen erkennbar, der sich scharf vom 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 Calciummessung im Strichrasterverfahren entlang der Linie von der Grenzfläche zur Umgebung zum Übergang von der dunkleren in die hellere Phase zeigt, dass die Calciumkonzentration innerhalb des dunkleren Bereichs relativ niedrig ist und beim Übergang zum helleren Bereich sprunghaft ansteigt.

Die Calciumauflösung 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 (Abb.32, 33). 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. Letzteres trifft auch bzgl. der Kalium- und Natriumauflösung aus Mikroklin und dem Mikroklin-ähnlichen Feldspat im Granit zu. Falls dies daran liegt, dass die Kalium- und

Natriumauflösung im Mikroklin und im Plagioklas so nah an der Oberfläche stattfindet, dass sie mit der räumlichen Auflösung der REM-Analysen nicht nachweisbar ist, würden die entsprechend gemessenen Eluatkonzentrationen trotzdem Sinn ergeben. In diesem Fall könnten TEM-Analysen die Verarmung der entsprechenden Elemente im mineralogischen Präparat nachweisen. Dies konnte in der Tat für Natrium im Albit und für Kalium im Mikroklin erfolgreich an Anschliffen von Mineralkörnern aus biotischen Proben nach 180 d Inkubation in den Durchfluss-Säulen gezeigt werden (Abb.34, 35).

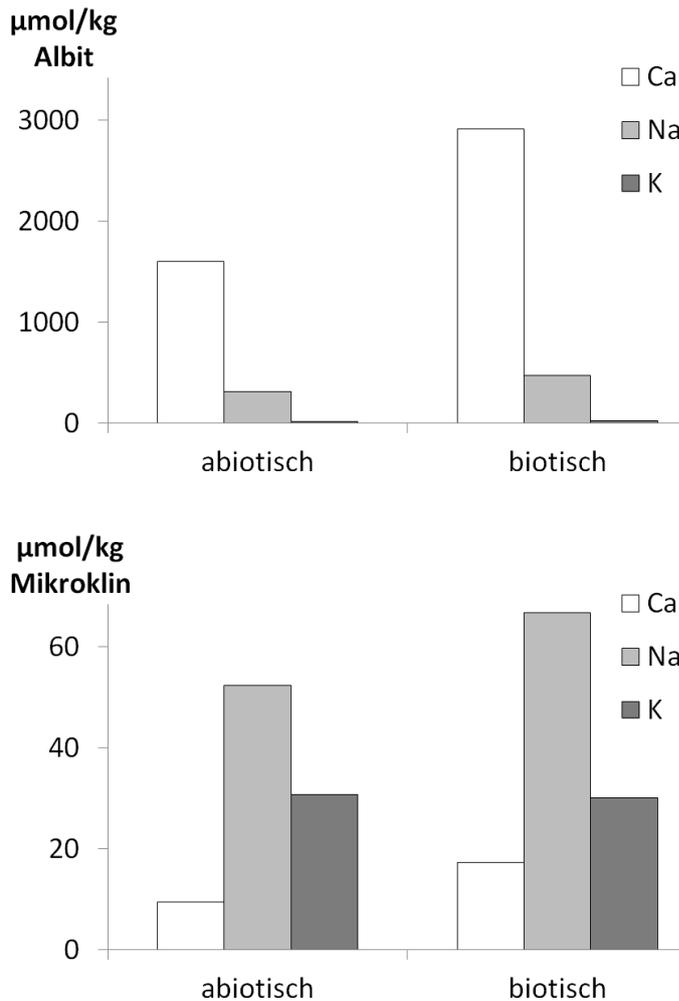


Abb.33: Per ICP-MS/OES gemessene Elementkonzentrationen in den Eluaten der Durchfluss-Experimente zur Verwitterung von Albit (oben) und Mikroklin (unten) (Methodik beschrieben in 2.2.5.1) nach 180 d Inkubation für die Elemente Ca, Na und K (n=1 für biotische und abiotische Proben mit Medium). Oben: Für die Albit-Eluate zeigen sich bzgl. des Calciums Unterschiede zwischen biotischer und abiotischer Probe, für Natrium nicht; Calcium weist hier deutlich höhere Werte auf als Natrium. Die Kaliumwerte sind vergleichsweise gering. Unten: Für die Mikroklin-Eluate zeigen sich leichte Unterschiede zwischen biotischer und abiotischer Probe bzgl. des Calciums und des Natriums. Kalium weist hier in beiden Proben die gleiche Konzentration auf, die jeweils über der von Calcium und unter der von Natrium liegt.

Messwerte, die direkt an der Oberfläche bis maximal 100 nm darunter ermittelt wurden, ergaben für Albit niedrigere Natriumkonzentrationen als Messwerte, die etwa 2 µm unterhalb der Oberfläche gemessen wurden (Abb.34). Die Calciumwerte zeigten hingegen keine Unterschiede. Da die Calciumverarmung sowohl für den Plagioklas im Granit als auch für den Albit per REM-EDS-Analysen über größere Distanzen von teilweise bis zu 10 µm nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, dass der Zustand an der unmittelbaren Oberfläche und 2 µm darunter ähnlich ist. Hier ist das Calcium bereits größtenteils entfernt,

erst in tieferen Schichten ist der Ausgangszustand zu finden. Für Natrium hingegen konnte weder im Albit noch im Plagioklas eine Auflösung per REM-EDS gezeigt werden (Abb.29, 32), bei der Anwendung von TEM mit der entsprechenden Auflösung von einzelnen Mikrometern bis in den Nanometerbereich wird jedoch klar, dass hier eine Natriumverarmung eben in dieser sehr nah an der Oberfläche liegenden Zone stattfand.

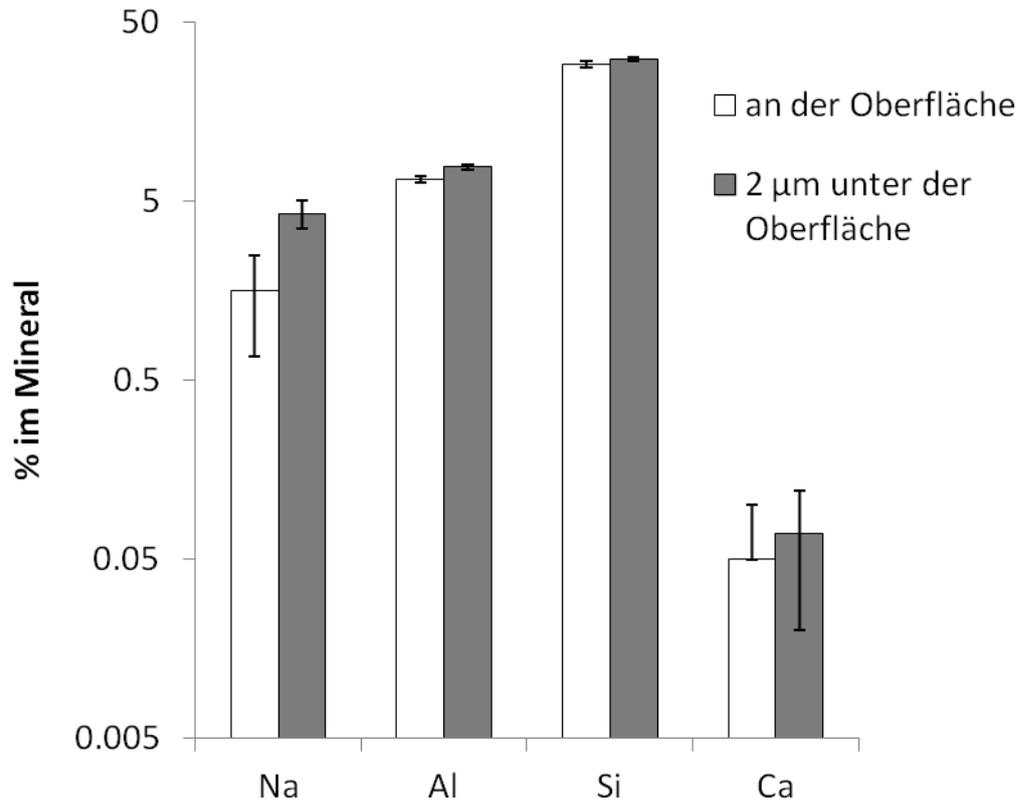


Abb.34: TEM-EDS-Analysen eines Anschliffpräparats von Albit nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Säulen (Methodik beschrieben in 2.2.5.1). Es wurden jeweils 10 Messpunkte direkt an der Oberfläche (maximal 100 nm darunter) und etwa 2  $\mu\text{m}$  unterhalb der Oberfläche gemessen. Der einzige signifikante Unterschied zwischen beiden Positionen konnte für Natrium gezeigt werden.

Ebenso konnte für Mikroclin per TEM-Analyse gezeigt werden, dass hier eine Verarmung von Kalium in diesem Bereich stattfand. Bereits 1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Oberfläche lagen die Kaliumwerte eindeutig höher als im Bereich zwischen der direkten Grenzfläche und etwa 100 nm darunter (Abb.35). REM-Analysen konnten für den Mikroclin und den Alkalifeldspat im Granit keine Unterschiede zwischen oberflächennahen und zentralen Messpunkten zeigen.

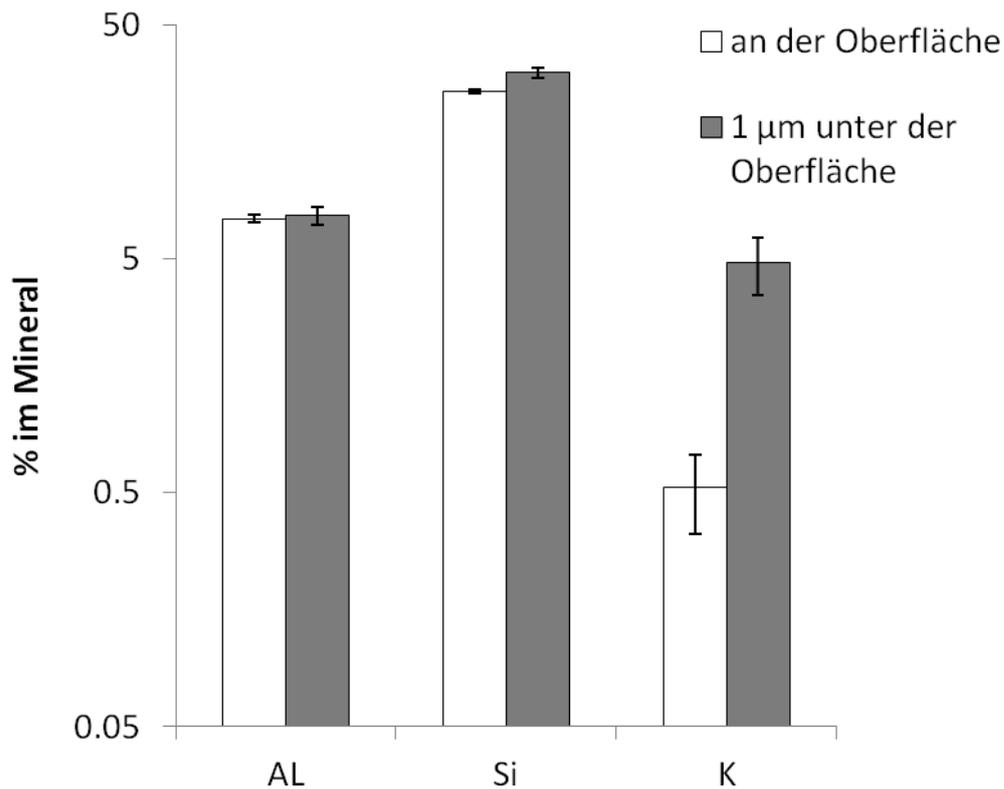


Abb.35: TEM-EDS-Analysen eines Anschliffpräparats von Mikroclin nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Säulen (Methodik beschrieben in 2.2.5.1). Es wurden jeweils 10 Messpunkte direkt an der Oberfläche (maximal 100 nm darunter) und etwa 1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Oberfläche gemessen. Der einzige signifikante Unterschied zwischen beiden Positionen konnte für Kalium gezeigt werden.

Die TEM-EDS-Daten sprechen dafür, dass das Kalium aus dem Mikroclin bzw. dem Alkalifeldspat und das Natrium aus dem Albit bzw. dem Plagioklas nur direkt bis einige 100 nm unter die Oberfläche hin entfernt wurde, das Calcium hingegen auch bis in wesentlich tiefere Schichten. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass die entsprechenden Verarmungen aus den TEM-EDS-Daten schon im Ausgangszustand der jeweiligen Gesteine vorlagen und nur durch die zufällige Auswahl der präparierten Mineralkörner ( $n=2$ ) nicht dort aber in den biotischen Proben nach 180 d Inkubation gefunden werden konnten.

Verglichen mit den Eluatkonzentrationen, die für den Granit gemessen wurden, liegen die Kaliumwerte für Albit und Mikroklin in der gleichen Größenordnung, die Natriumwerte sind für den Mikroklin etwas niedriger als die für Granit gemessenen. Die aus dem Albit freigesetzten Natrium- und Calciummengen übersteigen die aus dem Granit gelösten Mengen um das 5-10fache (Abb.25, 33). Aufgrund der höheren Auflöseraten von Feldspäten, speziell von Plagioklasen [64, 214], gegenüber Quarz und Glimmern ist zu erwarten, dass die Menge an gelöstem Natrium und Calcium mit der relativen Menge an Plagioklas im untersuchten Granitgestein zunimmt. Die von Plagioklasen bzw. Albit zur Verfügung gestellte Oberfläche in einem Granit reagiert in Verwitterungsreaktionen am schnellsten und bestimmt daher in entscheidendem Ausmaß die Konzentrationen der gelösten Elemente.

Die deutlich höheren Calcium- und Natriumkonzentrationen in den Eluaten für das Albit- gegenüber dem Granitexperiment sprechen daher dafür, dass der Großteil des aus dem Granit gelösten Calciums und Natriums aus dem dort vorkommenden Plagioklas stammt. Während im Granit die von Quarz und anderen langsamer verwitternden Mineralen bereitgestellte Oberfläche die Auflösung von Calcium und Natrium aus dem gesamten Gestein erniedrigt, steht im verwendeten Albit zu einem überwiegenden Teil nur  $\text{Na}_{1,0-0,9}\text{Ca}_{0,0-0,1}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$  zur Verfügung und die Konzentration des gelösten Natriums und Calciums müsste die im Granit ungefähr um den reziproken Wert des dort vorkommenden Plagioklasanteils übersteigen.

Die im Mikroklinexperiment freigesetzte Kaliummenge entspricht der im Granitexperiment beobachteten, obwohl die zur Verfügung stehende Mikroklin-haltige Oberfläche im erstgenannten Experiment deutlich größer war. Dies spricht dafür, dass das im Granitexperiment freigesetzte Kalium auch aus anderen Mineralen kommt. Zunächst liegt Kalium in geringen Mengen auch im Plagioklas vor und konnte im Albitexperiment in ähnlichen Mengen wie im Mikroklinexperiment im Eluat nachgewiesen werden. Weiterhin enthielt der im Granit vorkommende Biotit relevante Kaliummengen; die dort bereits im Ausgangszustand beobachtete Chloritisierung (Abb.23) bot wahrscheinlich auch Angriffspunkte zur weiteren Kaliumauflösung aus dem Biotit.

### **Biofilmstruktur auf dem Gestein**

Die Mikroorganismen in den biotischen Proben konnten auch über REM-Aufnahmen nachgewiesen werden (Abb.36). Dabei lagen sie über das gesamte Gestein verteilt vor, an bestimmten Positionen konnten allerdings deutlich höhere Dichten beider Biofilmpartner in Form von Mikrokolonien beobachtet werden. *N. punctiforme* trat oft in Form sehr langer Filamente auf, wie sie auch in Flüssigkulturen vorkommen. *K. petricola* bildete Ansammlungen von Zellen oder ebenfalls perlschnurartige Ketten, die allerdings deutlich

kürzer waren als die Filamente von *N. punctiforme*. Zudem wurden deutlich größere Strukturen gefunden (Abb.36, Nr.3), die Größen von 10-20 µm aufwiesen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um von *N. punctiforme* gebildete Zellpakete, die unter Stressbedingungen ausgebildet werden können [157, 175] und bereits im Rahmen anderer in dieser Arbeit beschriebener Versuche beobachtet wurden (siehe 3.2).

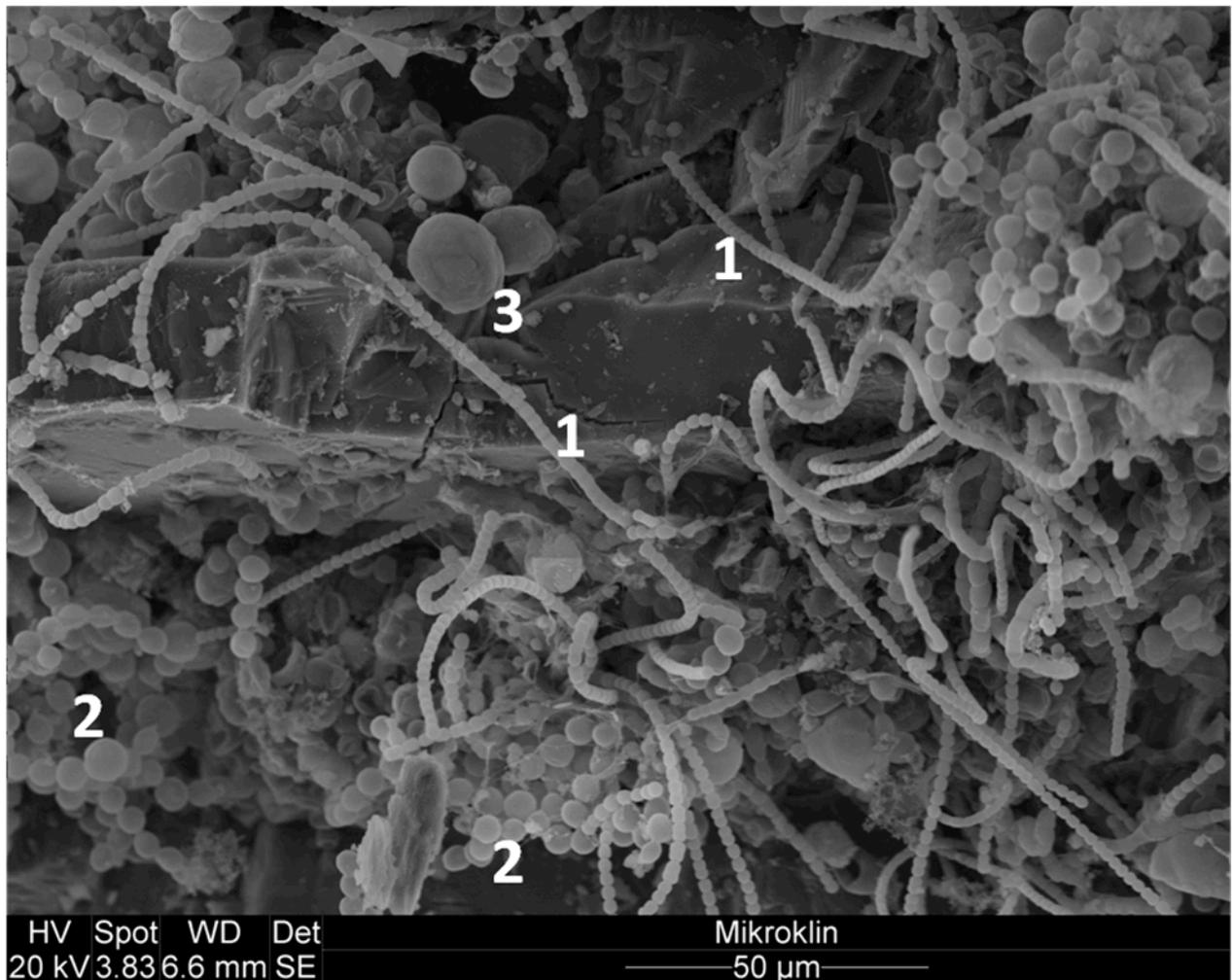


Abb.36: REM-Aufnahme eines Mikroklinkorns nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Säulen (Methodik beschrieben in 2.2.5.1). Man erkennt *N. punctiforme* (1) in Form langer Filamente und *K. petricola* (2) in Form sehr kurzer Fäden oder kolonieartiger Ansammlungen von Zellen. Die Zellen von *K. petricola* (2) sind deutlich größer als die von *N. punctiforme* (1). Vereinzelt kommen größere Strukturen mit einer Größe von 10-20 µm vor (3). Hierbei könnte es sich um die schon erwähnten Zellpakete handeln, die auch auf anderen Gesteinen beobachtet wurden (siehe 3.2) und generell unter Stressbedingungen gebildet werden können. Mehrere *N. punctiforme*-Zellen werden dabei innerhalb einer Hülle eingeschlossen.

Beide Biofilmpartner bildeten gemeinsam komplexe Strukturen innerhalb der Biofilme aus, welche durch die Bildung von EPS verstärkt wurden (Abb.37 links). Teilweise konnte auch eine im Mikromaßstab großflächig angelegte EPS-Schicht beobachtet werden, die die

mikrobiellen Zellen bedeckte und an einigen Stellen - vermutlich auch durch die Präparation für REM-Aufnahmen - abblätterte (Abb.37 rechts). Die EPS-Schicht kann auch Stoffwechselprodukte enthalten, die eine Mineralauflösung, wie sie beobachtet wurde, begünstigen würde. Der pH-Wert zwischen der EPS und dem Gestein kann dann deutlich niedriger sein als in der Lösung, was auch für den Bereich zwischen Zellen und Gestein zutrifft. Durch eine relativ großflächig angelegte EPS-Schicht kann natürlich die Fläche, welche den mikrobiell induzierten chemischen Auflösungsprozessen zur Verfügung steht, vergrößert werden.

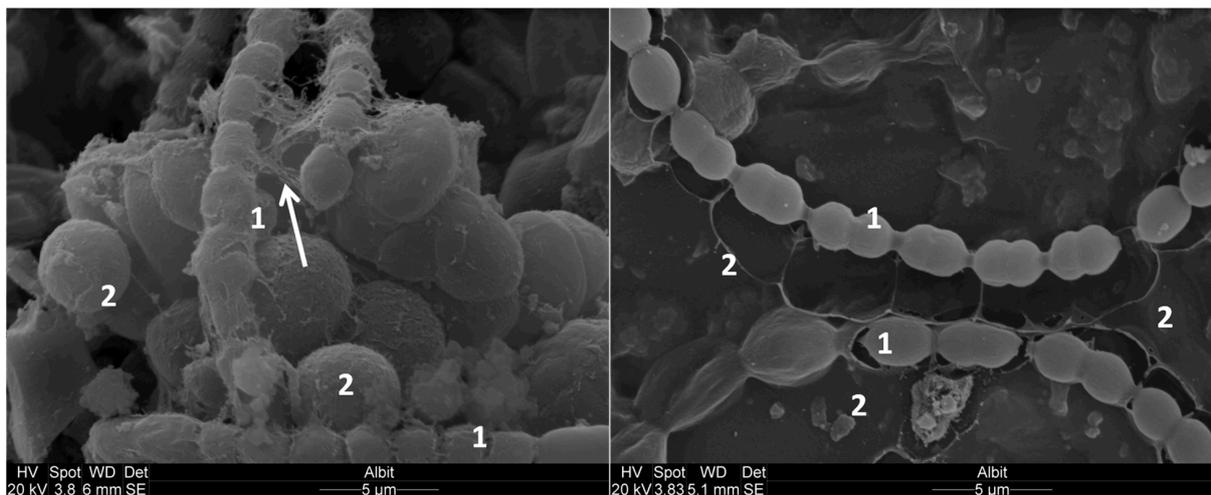


Abb.37: REM-Aufnahmen von Albitkörnern nach 180 d Inkubation mit Mikroorganismen in den Durchfluss-Säulen (Methodik beschrieben in 2.2.5.1). Links: *N. punctiforme* (1) und *K. petricola* (2) bilden komplexe Strukturen im Biofilm aus; zwischen und auf den Zellen ist die gebildete EPS erkennbar (markiert durch einen weißen Pfeil). Rechts: Die EPS-Schicht (2) deckt teilweise größere Flächen auf dem Gestein ab; die Zellen (1) liegen zu einem großen Teil auch unter dieser schützenden Schicht.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Granitverwitterung in den hier durchgeführten Experimenten in Anwesenheit des Modellbiofilms stärker war als in der abiotischen Kontrolle, was durch geochemische Analysen der Eluate und mineralogische Präparate gezeigt werden konnte. Der Mechanismus der verstärkten Auflösung konnte aufgrund der vorliegenden Daten nicht endgültig geklärt werden, da der pH-Wert in der Lösung sich über das Experiment in biotischen und abiotischen Proben nicht relevant veränderte. Physikalisch bedingte Angriffe durch das Hineinwachsen von Zellketten oder Filamenten in das Gestein konnten nicht beobachtet werden. Eine Ansäuerung der Fläche zwischen Biofilm und Gestein, welche durch die pH-Messung der Lösung nicht berücksichtigt werden konnte, erscheint als biotisch induzierter Faktor chemischer Verwitterung als möglich.

### 3.3.3 Verwitterung einzelner Minerale

Bei den Experimenten zur Verwitterung der Minerale Calcit, Forsterit und Olivin (Methodik beschrieben in 2.2.5.2) konnten nach 60 d Inkubation in den gelösten Phasen die Elemente Calcium, Magnesium und Silizium in quantifizierbarer Menge nachgewiesen werden. Für die Experimente mit Calcit konnte nur Calcium in der gelösten Phase nachgewiesen werden, für die Experimente mit Forsterit nur Magnesium und für die Experimente mit Olivin Magnesium und Silizium. Für die Calciumexperimente konnten dabei keine Unterschiede zwischen abiotischen und biotischen Proben beobachtet werden, die Kontrolle mit Millipore-Wasser als flüssiger Phase zeigte einen deutlich niedrigeren Wert (Abb.38). Bei den Experimenten mit Forsterit und Olivin wurden größere gelöste Magnesiummengen für die Proben mit Mischkulturen und mit Einzelkulturen von *K. petricola* beobachtet als für die abiotischen Proben und die Proben mit *N. punctiforme* (Abb.38).

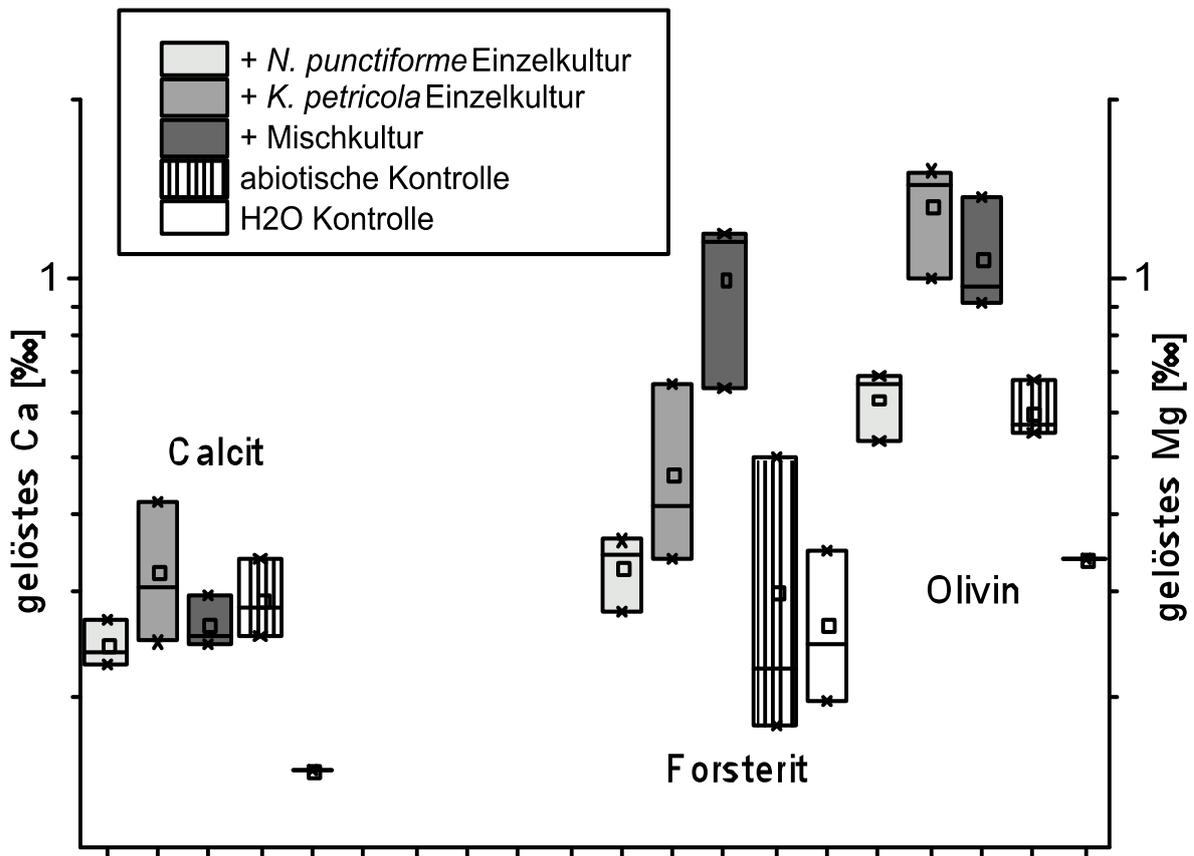


Abb.38: ICP-OES-Analysen der Elementkonzentrationen in den gelösten Phasen der Experimente zur Verwitterung von Calcit, Forsterit und Olivin (Methodik beschrieben in 2.2.5.2) nach 60d Inkubation. Für Calcit ist der daraus gelöste Calciumanteil, für Forsterit und Olivin sind jeweils die daraus gelösten Magnesiumanteile angegeben. Jeder Boxplot enthält jeweils die Werte der 3 durchgeführten Parallelansätze (n=3), bei den Wasserkontrollen für Calcit und Olivin lag jeweils nur 1 Wert über der Nachweisgrenze.

Für Forsterit lagen die Werte der abiotischen Proben innerhalb der gleichen Größenordnung wie für die Probe mit *N. punctiforme*, für Olivin zeigte die Probe mit Millipore-Wasser ähnlich wie für Calcit einen deutlich niedrigeren Wert. Für Calcit und Olivin lag jeweils nur ein Wert für das Triplikat der Millipore-Wasser-Proben über dem Quantifizierungslimit, für Forsterit hingegen alle drei Werte (Abb.38).

Eisen konnte weder für die Forsterit- noch für die Olivinproben in nachweisbarer Menge in der gelösten Phase ermittelt werden, für die Olivinproben traf dies allerdings auf Silizium zu. Die gelösten Siliziummengen lagen dabei deutlich unter den jeweiligen Magnesiummengen, das jeweilige Verhältnis von gelöstem Magnesium zum gelösten Silizium war für alle Proben sehr ähnlich, was für die Konsistenz der ermittelten ICP-OES-Daten spricht (Abb.39).

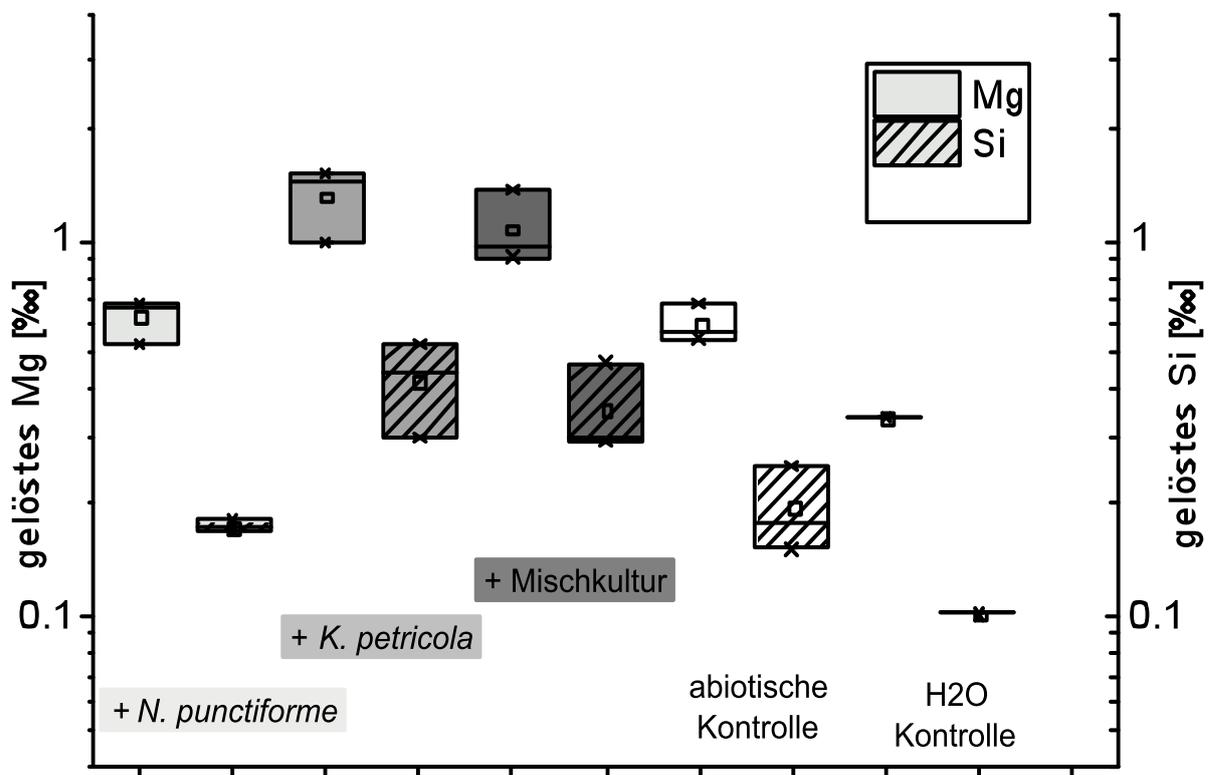


Abb.39: ICP-OES-Analysen der Elementkonzentrationen in den gelösten Phasen der Experimente zur Verwitterung von Olivin (Methodik beschrieben in 2.2.5.2) nach 60d Inkubation. Es sind die aus dem Olivin gelösten Magnesium- (unschraffiert) und Siliziumanteile (schraffiert) gezeigt, jeder Boxplot enthält jeweils die Werte der 3 durchgeführten Parallelansätze (n=3), für die Wasserkontrollproben lag nur 1 Wert über der Nachweisgrenze.

Das Wachstum von *K. petricola* und *N. punctiforme* in allen biotischen Proben bzw. das fehlende Wachstum in allen abiotischen Proben nach 60 d Inkubation konnte auf Basis der DNA-Menge per qPCR gezeigt werden (Abb.40, 41). In allen Proben wiesen die Mischkulturen mehr Zellzahläquivalente bzgl. beider Mikroorganismen auf als die jeweiligen Einzelkulturen. *K. petricola* zeigte dabei ähnliches Wachstum mit Forsterit und ohne Mineralzusatz, deutlich niedrigere Werte wurden für das Wachstum mit Olivin und Calcit beobachtet (Abb.40). *N. punctiforme* zeigte ähnliches Wachstum mit sämtlichen Mineralen sowie ohne Mineralzusatz (Abb.41).

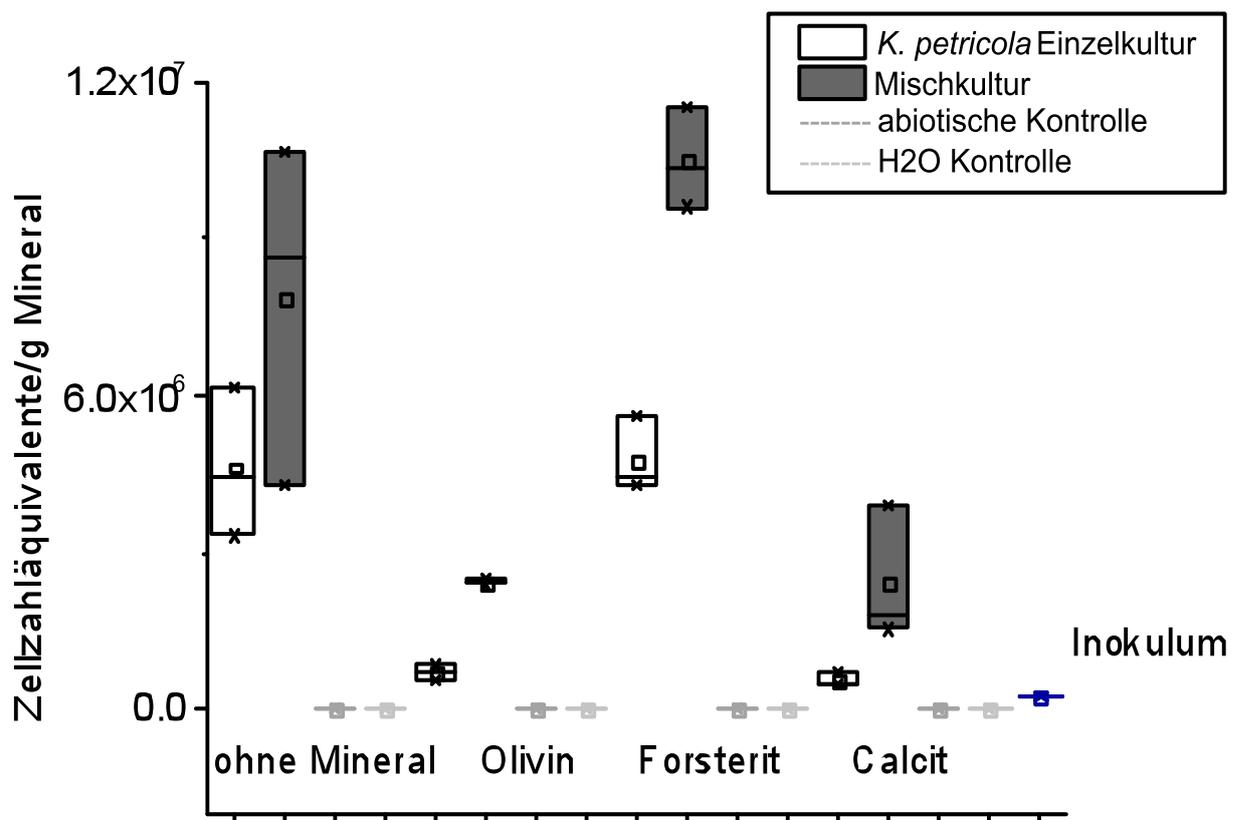


Abb.40: Ermittelte Abundanzen für *K. petricola* nach 60 d Inkubation in den Experimenten zur Verwitterung von Calcit, Forsterit und Olivin (Methodik beschrieben in 2.2.5.2). Ein Boxplot zeigt 3 Werte innerhalb eines Ansatzes an, die Abundanzen wurden in Einzel- und Mischkulturen (n=3) sowie in den abiotischen Kontrollen (n=1) für das Wachstum auf den Mineralen Olivin, Forsterit und Calcit nach Abschluss der Verwitterungsexperimente per qPCR gemessen. Als Kontrolle wurden zudem biotische Ansätze ohne Mineralzusatz gemessen. Die Umrechnung der DNA-Konzentrationen in Zellzahlen erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben.

Die *N. punctiforme*-Zellen scheinen also keinen erkennbaren Einfluss auf die Verwitterung der Minerale Calcit, Olivin und Forsterit zu haben (Abb.38) und ihr Wachstum ist von der Anwesenheit der verwendeten Minerale unabhängig (Abb.41). *K. petricola*-Zellen beeinflussen die Freisetzung von Magnesium aus Silikaten positiv (Abb.38), ihr Wachstum mit Olivin ist allerdings gegenüber dem in reiner Nährlösung gehemmt (Abb.40). Da das Wachstum mit Forsterit deutlich höher lag als das mit Olivin, liegt die Vermutung nahe, dass aus dem chemisch heterogeneren Olivin Spuren von Nickel freigesetzt wurden, welche einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *K. petricola* gehabt haben können.

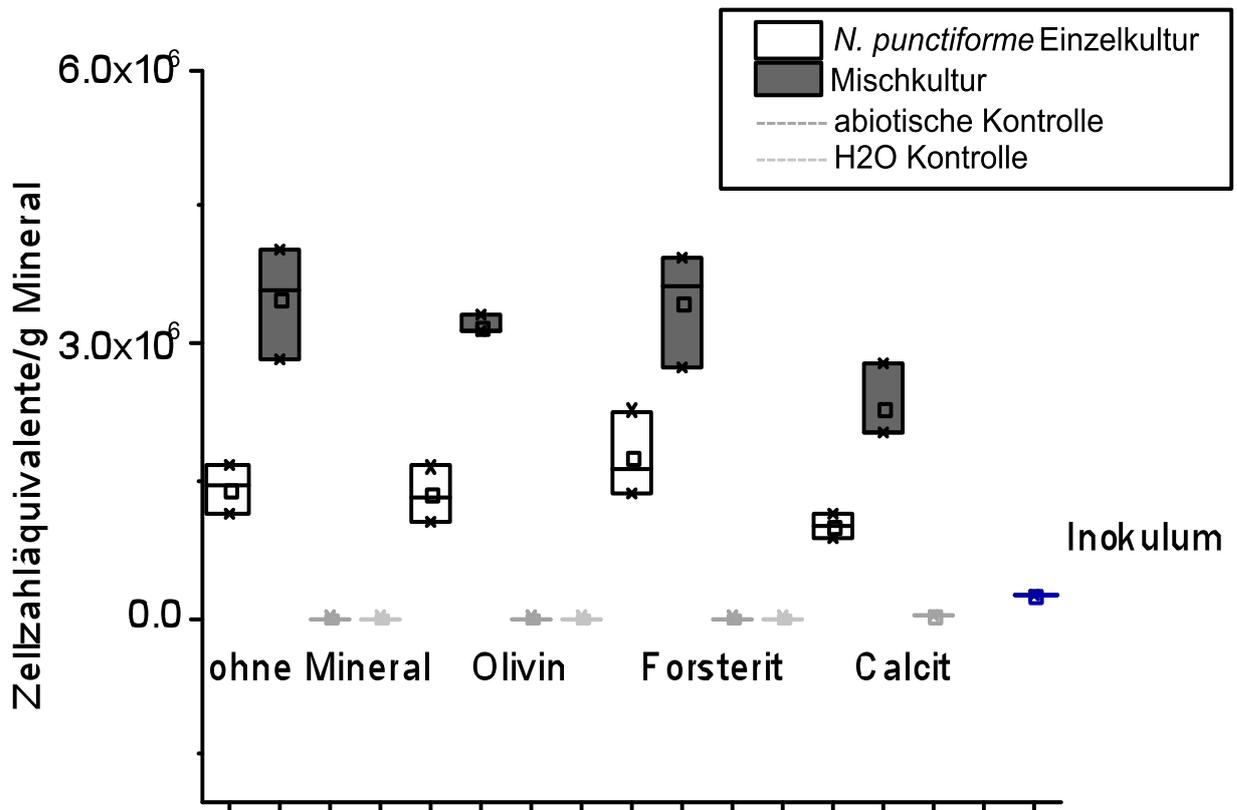


Abb.41: Ermittelte Abundanzen für *N. punctiforme* nach 60 d Inkubation in den Experimenten zur Verwitterung von Calcit, Forsterit und Olivin (Methodik beschrieben in 2.2.5.2). Ein Boxplot zeigt 3 Werte innerhalb eines Ansatzes an, die Abundanzen wurden in Einzel- und Mischkulturen (n=3) sowie in den abiotischen Kontrollen (n=1) für das Wachstum auf den Mineralen Olivin, Forsterit und Calcit nach Abschluss der Verwitterungsexperimente per qPCR gemessen. Als Kontrolle wurden zudem biotische Ansätze ohne Mineralzusatz gemessen. Die Umrechnung der DNA-Konzentrationen in Zellzahlen erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben.

Ein durch Olivin verursachter Anstieg an bioverfügbarem Nickel im Boden konnte in Studien am Weidelgras *Lolium perenne* gezeigt werden [245]. Da man zudem momentan davon ausgeht, dass Nickeltoxizität für Mikroorganismen auch in Umgebungen eine Rolle spielt, wo

Nickel nur in Spuren vorkommt [246], erscheint ein toxischer Effekt durch geringe Konzentrationen freigesetzten Nickels aus Olivin zumindest möglich. Per ICP-OES-Analysen konnten allerdings keine quantifizierbaren Mengen an Nickel nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass weder *K. petricola* noch *N. punctiforme* von der Anwesenheit der bereitgestellten Minerale bzgl. des Wachstums profitieren, wenn man es mit dem Wachstum ohne Mineralzusatz vergleicht (Abb. 40, 41). Der eindeutig messbare biotisch induzierte Anteil der Verwitterung durch Mischkulturen und Einzelkulturen von *K. petricola* (Abb. 38) muss aber zumindest durch die Anwesenheit der Mikroorganismen bzw. von diesen ausgeschiedener Metabolite verursacht worden sein. Ein durch Atmung induzierter Anstieg der CO<sub>2</sub>-Konzentration oder die Ausscheidung organischer Säuren, die in Stoffwechselwegen wie dem Citratzyklus anfallen, können zu einem Abfall des pH-Wertes führen und sind mögliche Faktoren, die Gesteinsangriffe bewirken können [17-20, 72, 73]. Der pH-Wert der Lösung fiel in sämtlichen Experimenten von anfänglich zwischen 8,8 und 8 auf einen Wert von etwa 7 ab (Tab. 9). Der Abfall war für biotische und abiotische Experimente sehr ähnlich und kann daher nicht als Grund für die verstärkte biotische Auflösung von Forsterit und Olivin gesehen werden. Wie bereits bei der Verwitterung von Granit diskutiert (3.3.2), kann der pH-Wert sich in der direkten Mikroumgebung von Kolonien, speziell zwischen Biofilm und Substrat, von dem der umgebenden Lösung unterscheiden [25, 239-241]. Eine lokale Ansäuerung des Milieus, die aufgrund des begrenzten Raumes zwischen Mikroorganismen im Biofilm und dem Substrat durch eine starke Konzentrierung entsprechender Metabolite begründet sein konnte, könnte dann eine verstärkte Auflösung von Olivin und Forsterit in den biotischen Ansätzen verursacht haben, ohne dass in der gesamten Lösung eine damit korrespondierende pH-Wertänderung einherging.

Die sehr ähnliche Calcitauflösung in biotischen und abiotischen Ansätzen könnte darin begründet liegen, dass die Lösung bzgl. des Calcits für alle Experimente nahe dem Sättigungszustand lag und somit auch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen keine Steigerung der Mineralauflösung bewirken konnten. Eine Sättigung tritt ein, wenn das Löslichkeitsprodukt einer Verbindung innerhalb einer entsprechenden Lösung erreicht wird. Die Calciumkonzentrationen in der Lösung lagen zum Zeitpunkt der Messung in der Größenordnung von 50 mg/l. Abschätzungen oberer Grenzen für mögliche Calcitlöslichkeiten in Erdoberflächennähe liegen bzgl. des Calciums mit 128 mg/l zwar zwei- bis dreifach höher [247], da es sich dabei um Modellrechnungen handelt, ist es aufgrund der finalen gemessenen Calciumkonzentrationen im hier durchgeführten Experiment durchaus möglich, dass die Bedingungen nahe dem Sättigungszustand lagen. Dies würde zudem eine pH-Pufferung bewirken, sodass ausgeschiedenes CO<sub>2</sub> aus Atmungsprozessen oder

organische Säuren, die aus Stoffwechselwegen anfielen, keinen Effekt gehabt haben konnten.

Tab. 9. Gemessene pH-Werte der Flüssigphasen in den Experimenten zur Verwitterung von Calcit, Forsterit und Olivin (Methodik beschrieben in 2.2.5.2).

<b>Probe</b>	<b>Calcit Experimente</b>	<b>Forsterit Experimente</b>	<b>Olivin Experimente</b>
pH vor dem Experiment	8,8	8,4	8
pH nach Inkubation mit Mischkultur	7	7	7,2
pH nach Inkubation mit <i>K. petricola</i>	7	7	7,1
pH nach Inkubation mit <i>N. punctiforme</i>	7	7,1	7
pH nach Inkubation mit Verwitterungsmedium 2	7,2	7,2	6,9
pH nach Inkubation mit Millipore-Wasser	7,3	7,1	7

Speziell für Calcit wird angenommen, dass Auflöseraten stark von der Verteilung von Ätzgruben auf der Mineraloberfläche abhängen und bei Vorhandensein vieler solcher Ätzgruben erhöht werden [98]. Die Bildung solcher Ätzgruben kann von Mikroorganismen beeinflusst werden, wenn eine Kolonisierung an einer entsprechenden Position auf einem Mineralkorn stattfindet. Dabei wurde für Kulturen von *Shewanella oneidensis* gezeigt, dass diese Auflöseprozesse im Vergleich zu abiotischen Kontrollen auch verlangsamen können, indem ihre Kolonisierung an Stellen einer beginnenden Ätzgrubenbildung letztere behindern können [83]. Generell kann die mikrobiell induzierte Auflösung von Mineralen im makro- und im mikroskalaren Bereich wirken, wobei erstgenannte mit einer Veränderung des pH-Wertes in der Lösung einhergehen müsste [248]. Ein mikrobieller Angriff zwischen Mineral und Biofilm im mikroskalaren Bereich verlangt natürlich, dass sich Mikrokolonien auf den Mineralkörnern bilden. Die Ausbildung solcher Mikrokolonien hängt von der Oberfläche und der Rauigkeit von Mineralkörnern ab. Rauere Mineralkörner bieten nicht nur eine relativ größere Oberfläche sondern erleichtern zudem die Kolonisierung der Oberfläche, da der sich ausbildende Biofilm besser geschützt ist als auf glatteren Oberflächen [210, 213]. Zieht man Dichten für Calcit, Forsterit und Olivin nach [249] zu Rate (Tab. 10), so zeigt Calcit die niedrigste Dichte und müsste bei gleicher Masse an eingesetztem Ausgangsmaterial die größte Oberfläche besitzen, sofern es sich um absolut glatte und runde Mineralkörner handelt. Gemessene BET-Oberflächen sind allerdings für Forsterit und Olivin größer, was für eine größere Rauigkeit letzterer Minerale gegenüber Calcit spricht (Tab.10). Wenn nun eine

größere Rauigkeit im Fall von Forsterit und Olivin ein Wachstum von Mikrokolonien begünstigt hat und im Fall von Calcit nicht, haben Effekte, wie sie im Zwischenraum von Mikrokolonien und Mineral durch die Ausbildung eines Mikromilieus diskutiert wurden, wahrscheinlich für die beiden Silikate einen relevanteren Einfluss. Bei Calcit könnte eher die Chemie im makroskalaren Bereich gewirkt und daher eine Auflösung in allen Proben auf gleiche Weise stattgefunden haben, bis eine Calciumsättigung bzgl. des Calcits in der Lösung eintrat und die weitere Auflösung gehemmt war.

Tab. 10. Vorher gemessene BET-Oberflächen (Methodik in 2.2.5.2) und Dichten nach [249] für die verwendeten Minerale

<b>Mineral</b>	<b>BET-Oberfläche [m<sup>2</sup>/g]</b>	<b>Dichte [g/cm<sup>3</sup>]</b>
Calcit	0,7796	2,6-2,8
Forsterit	2,1494	3,28
Olivin	1,9805	3,2-4,4

Aus den erhaltenen Calcium- und Magnesiumkonzentrationen in den Lösungen der Verwitterungsexperimente für Calcit, Forsterit und Olivin nach 60 d Inkubation können Auflöseraten für die entsprechenden Minerale berechnet werden, welche logischerweise die gleichen Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen der durchgeführten Experimente liefern wie die Konzentrationswerte *per se*. Vergleicht man die so berechneten Auflöseraten mit solchen aus anderen Studien, die bzgl. der Parameter Temperatur und pH-Wert ähnliche Randbedingungen hatten, so liegen sie deutlich unter diesen (Tab.11).

Tab. 11. Abgeschätzte Auflöseraten für Calcit bzgl. Calciums und für Forsterit und Olivin bzgl. Magnesiums unter Berücksichtigung gemessener BET-Oberflächen (siehe Tab.10). Vergleichend dazu sind einige Raten aus der Literatur aufgelistet, deren Randbedingungen bzgl. der Parameter pH-Wert und Temperatur denen der hier durchgeführten Experimente ähnlich waren (andernfalls sind relevante Unterschiede jeweils angegeben).

\* Oberfläche wurde nach der BET-Methode gemessen [201]

\*<sup>2</sup> Oberfläche wurde nach der ASTM C204-55 Standard-Methode gemessen

<b>Mineral</b>	<b>Experimentelle Bedingung</b>	<b>Auflöserate* [log(Mol/m<sup>2</sup>*s)]</b>
Calcit	mit Mischkultur	-12,19

Mineral	Experimentelle Bedingung	Auflöserate* [ $\log(\text{Mol/m}^2\cdot\text{s})$ ]
Calcit	Mit <i>K. petricola</i> -Einzelkultur	-12,10
Calcit	mit <i>N. punctiforme</i> -Einzelkultur	-12,22
Calcit	mit Verwitterungsmedium 2	-12,14
Calcit	mit Millipore-Wasser	-12,43
Calcit	Cubillas et al. [216]	-6,77
Calcit	Sjöberg, in [98]	-5
Calcit	Jordan et Rammensee, in [98]	-7 (pH6)
Calcit	Arvidson et al. [98]	-7 (pH 8,8)
Forsterit	mit Mischkultur	-11,90
Forsterit	mit <i>K. petricola</i> -Einzelkultur	-12,22
Forsterit	mit <i>N. punctiforme</i> -Einzelkultur	-12,38
Forsterit	mit Verwitterungsmedium 2	-12,42
Forsterit	mit Millipore-Wasser	-12,47
Forsterit	Wogelius et Walther [250]	-9,80
Forsterit	Golubev et al. [251]	-9,88
Forsterit	Luce et al., in [252]	-7,40 <sup>*2</sup>
Forsterit	Blum et Lasaga, in [252]	-11,6
Olivin	mit Mischkultur	-11,89
Olivin	mit <i>K. petricola</i> -Einzelkultur	-11,80
Olivin	mit <i>N. punctiforme</i> -Einzelkultur	-12,12
Olivin	mit Verwitterungsmedium 2	-12,15
Olivin	mit Millipore-Wasser	-12,87

Dabei fällt auf, dass auch unter den Verwitterungsdaten aus der Literatur, welche jeweils auf abiotischen Experimenten ohne eine Zugabe von Mikroorganismen beruhen, deutliche Unterschiede zu Tage treten. Die Auflöseraten für Forsterit liegen teilweise um vier Zehnerpotenzen auseinander. Auf die Probleme von stark abweichenden Auflöseraten des gleichen Minerals in verschiedenen Studien wurde bereits hingewiesen, wobei experimentelle Zeiträume und Ätzgruben-abhängige Reaktionsmechanismen eine Rolle spielen können [97, 99]. Die Oberfläche eines Minerals kann sich ebenfalls während eines Experimentes z.B. aufgrund von Ätzgrubenbildung deutlich ändern, was in einer Änderung der Auflöserate resultieren würde. Solche Änderungen der Oberfläche konnten z.B. für Forsterit gezeigt werden [253] und bilden ein großes Problem beim Hochskalieren von Auflöseraten auf lange Zeiträume.

Die Experimente in den aufgelisteten Studien wurden teilweise in Durchfluss-Reaktoren durchgeführt wie bei Blum und Lasaga [254], teilweise in Batch-Kulturen wie bei Luce et al. [255], wobei immer eine fortwährende Bewegung des verwendeten Mediums vorlag. Eine solche Bewegung, die in den anderen Studien entweder durch ein Rühren der Lösung oder einen Durchfluss gewährleistet war, fehlte in den hier durchgeführten Batch-Experimenten, was zu den relativ niedrig abgeschätzten Raten geführt haben könnte. Zudem basieren die Auflöseraten lediglich auf einem Startwert für die verwendete Lösung und dem finalen Wert nach 60 d Inkubationszeit. Eine derartig berechnete Auflöserate würde höchstens für einen perfekt linearen Verlauf der Mineralauflösung über die Zeit funktionieren. Hyper- und parabolische Verläufe oder Wechsel zwischen diesen und linearen Phasen der Mineralauflösung, wie sie teilweise auch für Forsterit beschrieben wurden [255], verlangten nach vielen über den experimentellen Zeitraum verteilten Messpunkten der Mineralauflösung, um daraus Auflöseraten berechnen zu können.

Es bleibt daher abschließend festzuhalten, dass aufgrund der gemessenen Elementkonzentrationen nach 60 d Inkubation Unterschiede zwischen biotischen und abiotischen Proben für die verwendeten Silikate bzgl. des Magnesiums und teilweise des Siliziums festgestellt werden konnten, nicht aber für Calcium im Calcit (Abb.38, 39). Für die Berechnung von Auflöseraten liegen allerdings zu wenige Werte vor.

## 4. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Mischkulturen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* als ein einfaches Modell für die ersten Phasen der Gesteinsbesiedlung eignen. Verglichen mit den entsprechenden Einzelkulturen wachsen beide Organismen besser in Mischkulturen, sowohl auf Nährmedien als auch auf Gesteinssubstraten, was für eine mutualistische Beziehung untereinander spricht.

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. Bei feuchteren Bedingungen mit einer höheren Wasseraktivität auf der Gesteinsoberfläche, wie sie in Experimenten mit einem Durchflusssystem mit tropfenweiser Zugabe von Nährlösung realisiert waren, wachsen *N. punctiforme*-Zellen filamentös. Unter weniger feuchten Bedingungen wächst *N. punctiforme* auf der Gesteinsoberfläche in Form von Zellpaketen, die eine wesentlich größere Kompaktheit der Zellen innerhalb des Biofilms ermöglichen. *K. petricola* zeigt weniger Variabilität bzgl. der Zellformen und ist stets in den unteren Schichten sich bildender Biofilme nahe der Grenzfläche zum Gestein zu finden. 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 biochemische Charakterisierung der EPS durch die Analyse der darin vorkommenden Monosaccharide per HPLC ist bisher nicht reproduzierbar. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass das Wachstum des Modellbiofilms von verschiedenen Umweltfaktoren abhängig ist. Die Gesteinspräferenzen sind Temperatur-abhängig und unterschieden sich zwischen beiden Biofilmpartnern. *K. petricola* wächst tendenziell besser auf poröseren Gesteinen, *N. punctiforme* wächst bei optimaler Temperatur auf glatten, wenig porösen Gesteinen vergleichsweise gut, bei nicht optimalen Temperaturen hingegen vergleichsweise schlecht. Ein Wachstum findet bei 35°C nur durch *N. punctiforme* statt, *K. petricola* überlebt einen solchen Zustand für einen Zeitraum von drei Tagen nicht, auch wenn anschließend die optimale Wachstumstemperatur angeboten wird. Der experimentelle Aufbau zur Untersuchung des Wachstums unter verschiedenen Umweltbedingungen war relativ komplex, da Gesteine als Substrat verwendet wurden, welche sich in ihrer Zusammensetzung bzgl. mehrerer Eigenschaften unterschieden. Die Erforschung des Effekts einzelner Parameter verlangt einen weniger komplexen Aufbau. Um das Wachstum in Abhängigkeit von einzelnen physikalischen oder chemischen Parametern zu untersuchen, kann das experimentelle Design derart modifiziert werden, dass sich die einzusetzenden

Gesteine nur in den zu untersuchenden Parametern unterscheiden. Einfach strukturierte und gut charakterisierte Minerale bieten dazu eine Möglichkeit. Ein Beispiel bieten verschiedene Marmor-Typen mit unterschiedlichen Porositäten, wie sie in einer Studie zur Untersuchung der Biegung von Marmorplatten in Gebäudefassaden verwendet wurden [256].

Die vorliegende Arbeit konnte weiterhin die Erkenntnis hervorbringen, 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 der Modellbiofilm bei komplexen Gesteinen wie Granit und bei einfachen Mineralen wie Forsterit einen signifikanten Einfluss auf die Auflösung bestimmter Elemente hat. Dies konnte auf der Grundlage zwei verschiedener experimenteller Systeme (Durchfluss-Säulen und Batch-Kulturen) 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. Neue technologische Entwicklungen zur Messung von pH-Werten in mikroskalärer Auflösung durch den Einsatz von fluoreszierenden Sonden sind ein vielversprechender Ansatz zur weiteren Erforschung möglicher chemischer Mechanismen biologisch induzierter Verwitterung [81, 257]. Die Einführung des Modellbiofilms für Experimente zu biotisch induzierter Verwitterung kann zudem zum besseren Verständnis der Verwitterung von Baustoffen und potentiellen Gegenmaßnahmen beitragen. Eine Optimierung der in der Arbeit verwendeten Testsysteme ist dafür erforderlich. Reaktionsgefäße sollten aus möglichst inerten Materialien wie z.B. Polystyren bestehen, wie es für die Experimente zur Verwitterung einzelner Minerale in der vorliegenden Arbeit der Fall war, um mögliche Fehlerquellen durch Kontaminationen chemischer Art aus eingesetzten Materialien zu reduzieren. Um die Auflösung von Mineralen auch in reproduzierbaren Auflöseraten evaluieren zu können, sind experimentelle Aufbauten von Vorteil, welche zahlreiche Probennahmen ohne einen deutlichen Einfluss auf den Fortlauf des Experimentes ermöglichen. Durchfluss-Systeme führen im Vergleich zu Batch-Systemen meist zu einer größeren Bewegung von Flüssigkeit in einem Reaktionsgefäß und können daher Auflöseraten durch Prozesse der Erosion erhöhen. Zudem steigt die Verteilung von Sauerstoff innerhalb der Flüssigphase mit zunehmender Bewegung der Flüssigkeit, ebenso wie der Transport von Nährstoffen, Abfallprodukten oder gelösten toxischen Elementen [258]. Ein schnellerer Abtransport von toxischen Elementen und eine bessere Sauerstoff- und Nährstoffdurchmischung können mikrobielles Wachstum beschleunigen. Durchfluss-Systeme können daher Auflöseraten direkt über physikalisch-chemische Prozesse und indirekt über die Verstärkung biologischen Wachstums und damit biotisch induzierter

Verwitterung erhöhen. Ein schnellerer Durchfluss beinhaltet aber auch immer die Gefahr, dass mikrobielle Zellen innerhalb des Reaktionsgefäßes in stärkerem Maß transportiert werden und damit weniger Einfluss auf die Verwitterung von Mineralen durch die Ausbildung von fest am Gestein anhaftenden Biofilmen haben können. Verwendete Nährlösungen für eingesetzte Mikroorganismen sollten eine möglichst minimale Elementzusammensetzung aufweisen, um das experimentelle System einfach zu halten. Für die in der Arbeit verwendeten Mikroorganismen ist ein Wachstum mit einer Nährlösung, welche nur aus Milliporewasser, Glucose und Spuren von Thiaminhydrochlorid besteht, möglich.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich Mischkulturen aus *K. petricola* und *N. punctiforme* als Modell für Gesteinsbesiedlung und biotisch induzierte Gesteinsverwitterung eignen. Einige Effekte, wie z.B. der positive Einfluss von *N. punctiforme* auf das Wachstum von *K. petricola* in Mischkulturen und damit auf die Mineralauflösung, werden in Untersuchungen mit Einzelkulturen unterschätzt. Daher ist der Einsatz von Mischkulturen sinnvoll, auch wenn sich ausbildende Biofilme einen gegenüber Einzelkulturen erhöhten Grad an Komplexität aufweisen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. McNamara, C.J. and R. Mitchell, *Microbial deterioration of historic stone*. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2005. 3(8): p. 445-451.
2. Ortega-Morales, O., et al., *Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico*. *Current Microbiology*, 2000. 40(2): p. 81-85.
3. Suihko, M.L., et al., *Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments*. *Syst Appl Microbiol*, 2007. 30(6): p. 494-508.
4. Dornieden, T., A.A. Gorbushina, and W.E. Krumbein, *Biodecay of cultural heritage as a space/time-related ecological situation - an evaluation of a series of studies*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000. 46(4): p. 261-270.
5. Scheerer, S., O. Ortega-Morales, and C. Gaylarde, *Microbial Deterioration of Stone Monuments-An Updated Overview*. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 66, 2009. 66: p. 97-139.
6. Diakumaku, E., et al., *Black Fungi in Marble and Limestones - an Aesthetical, Chemical and Physical Problem for the Conservation of Monuments*. *Science of the Total Environment*, 1995. 167: p. 295-304.
7. Gorbushina, A.A., et al., *Role of Black Fungi in Color-Change and Biodeterioration of Antique Marbles*. *Geomicrobiology Journal*, 1993. 11(3-4): p. 205-221.
8. Urzi, C., et al., *Are Color Changes of Rocks Caused by Climate, Pollution, Biological Growth, or by Interactions of the 3*. *Conservation of Stone and Other Materials*, Vols 1 and 2, 1993: p. 279-286.
9. Urzi, C. and M. Realini, *Colour changes of Notos calcareous sandstone as related to its colonisation by microorganisms*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998. 42(1): p. 45-54.
10. Krumbein, W., *Über den Einfluß der Mikroflora auf die exogene Dynamik (Verwitterung und Krustenbildung)*. *Geologische Rundschau*, 1968. 58(2): p. 333-363.
11. Warscheid, T. and J. Braams, *Biodeterioration of stone: a review*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000. 46(4): p. 343-368.
12. Banfield, J.F., et al., *Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. 96(7): p. 3404-3411.
13. Gorbushina, A.A., *Life on the rocks*. *Environ Microbiol*, 2007. 9(7): p. 1613-31.
14. Crispim, C.A. and C.C. Gaylarde, *Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: A review*. *Microbial Ecology*, 2005. 49(1): p. 1-9.
15. Jongmans, A.G., et al., *Rock-eating fungi*. *Nature*, 1997. 389(6652): p. 682-683.

16. de los Rios, A. and C. Ascaso, *Contributions of in situ microscopy to the current understanding of stone biodeterioration*. International Microbiology, 2005. 8(3): p. 181-188.
17. Weber, B., et al., *Respiration-induced weathering patterns of two endolithically growing lichens*. Geobiology, 2011. 9(1): p. 34-43.
18. Delatorre, M.A., et al., *Biochemical-Mechanisms of Stone Alteration Carried out by Filamentous Fungi Living in Monuments*. Biogeochemistry, 1993. 19(3): p. 129-147.
19. Machill, S., et al., *Identification of organic compounds extracted from black weathered surfaces of Saxonean sandstones, correlation with atmospheric input and rock inhabiting microflora*. Organic Geochemistry, 1997. 27(1-2): p. 79-97.
20. Gomezalarcon, G., M.L. Munoz, and M. Flores, *Excretion of Organic-Acids by Fungal Strains Isolated from Decayed Sandstone*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1994. 34(2): p. 169-180.
21. Brantley, S.L., et al., *Twelve testable hypotheses on the geobiology of weathering*. Geobiology, 2011. 9(2): p. 140-165.
22. Chadwick, O.A., G.H. Brimhall, and D.M. Hendricks, *From a Black to a Gray Box - a Mass Balance Interpretation of Pedogenesis*. Geomorphology, Vol 3, No 3/4, Special Issue, 1990: p. 369-390.
23. Amundson, R., 5.01 - *Soil Formation*, in *Treatise on Geochemistry*, H.D. Holland and K.K. Turekian, Editors. 2003, Pergamon: Oxford. p. 1-35.
24. Macalady, J. and J.F. Banfield, *Molecular geomicrobiology: genes and geochemical cycling*. Earth and Planetary Science Letters, 2003. 209(1-2): p. 1-17.
25. Ehrlich, H.L., *Geomicrobiology: its significance for geology*. Earth-Science Reviews, 1998. 45(1-2): p. 45-60.
26. Gadd, G.M., *Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation*. Mycol Res, 2007. 111: p. 3-49.
27. *Lithosphere as Microbial Habitat*, in *Geomicrobiology, Fifth Edition* 2008, CRC Press. p. 37-55.
28. Hart, M.H., *The evolution of the atmosphere of the earth*. Icarus, 1978. 33(1): p. 23-39.
29. *The Hydrosphere as Microbial Habitat*, in *Geomicrobiology, Fifth Edition* 2008, CRC Press. p. 57-87.
30. *Earth as a Microbial Habitat*, in *Geomicrobiology, Fifth Edition* 2008, CRC Press. p. 5-13.
31. Searle, A.B., *Weathering of natural building stones*. By R. J. Schaffer, B.A., B.Sc. Department of Scientific and Industrial Research. Building Research. Special Report No. 18. Pp. x + 149. London: H.M. Stationery Office, 1932. 4s. 6d. Journal of the Society of Chemical Industry, 1932. 51(52): p. 1068-1069.
32. Doehne, E., *Salt weathering: a selective review*. Geological Society, London, Special Publications, 2002. 205(1): p. 51-64.

33. Zeisig, A., S. Siegesmund, and T. Weiss, *Thermal expansion and its control on the durability of marbles*. Geological Society, London, Special Publications, 2002. 205(1): p. 65-80.
34. Malaga-Starzec, K., J.E. Lindqvist, and B. Schouenborg, *Experimental study on the variation in porosity of marble as a function of temperature*. Geological Society, London, Special Publications, 2002. 205(1): p. 81-88.
35. Shushakova, V., E. Fuller, Jr., and S. Siegesmund, *Microcracking in calcite and dolomite marble: microstructural influences and effects on properties*. Environmental Earth Sciences, 2013. 69(4): p. 1263-1279.
36. Bonazza, A., et al., *Climate change impact: Mapping thermal stress on Carrara marble in Europe*. Science of the Total Environment, 2009. 407(15): p. 4506-4512.
37. Ollier, C.D., *Insolation weathering; examples from central Australia*. American Journal of Science, 1963. 261(4): p. 376-381.
38. McFadden, L.D., et al., *Physical weathering in arid landscapes due to diurnal variation in the direction of solar heating*. Geological Society of America Bulletin, 2005. 117(1-2): p. 161-173.
39. Thomachot, C. and D. Jeannette, *Evolution of the petrophysical properties of two types of Alsatian sandstone subjected to simulated freeze-thaw conditions*. Geological Society, London, Special Publications, 2002. 205(1): p. 19-32.
40. Ondrasina, J., D. Kirchner, and S. Siegesmund, *Freeze-thaw cycles and their influence on marble deterioration: a long-term experiment*. Geological Society, London, Special Publications, 2002. 205(1): p. 9-18.
41. Ruedrich, J., D. Kirchner, and S. Siegesmund, *Physical weathering of building stones induced by freeze-thaw action: a laboratory long-term study*. Environmental Earth Sciences, 2011. 63(7-8): p. 1573-1586.
42. Chahal, R.L.S., *Supercooling of water in glass capillaries* 1961, [Ithaca, N. Y.]. iv, 38 l.
43. Makarieva, A.M., et al., *Where do winds come from? A new theory on how water vapor condensation influences atmospheric pressure and dynamics*. Atmos. Chem. Phys., 2013. 13(2): p. 1039-1056.
44. Camuffo, D., *Physical weathering of stones*. Science of the Total Environment, 1995. 167(1-3): p. 1-14.
45. MUSTOE, G.E., *The origin of honeycomb weathering*. Geological Society of America Bulletin, 1982. 93(2): p. 108-115.
46. Tambach, T.J., P.G. Bolhuis, and B. Smit, *A Molecular Mechanism of Hysteresis in Clay Swelling*. Angewandte Chemie, 2004. 116(20): p. 2704-2706.
47. Cassar, J., *Deterioration of the Globigerina Limestone of the Maltese Islands*. Geological Society, London, Special Publications, 2002. 205(1): p. 33-49.
48. Winkler, E., *Stone Decay by Plants and Animals*, in *Stone* 1975, Springer Vienna. p. 154-163.

49. Winkler, E., *Weathering and weathering rates of natural stone*. Environmental Geology and Water Sciences, 1987. 9(2): p. 85-92.
50. Chen, J., H.P. Blume, and L. Beyer, *Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review*. Catena, 2000. 39(2): p. 121-146.
51. Gorbushina, A.A., et al., *How and why do rocks turn black - A history of surface biogeochemistry*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2003. 67(18): p. A123-A123.
52. Sterflinger, K., *Fungi as geologic agents*. Geomicrobiology Journal, 2000. 17(2): p. 97-124.
53. Chertov, O., A. Gorbushina, and B. Deventer, *A model for microcolonial fungi growth on rock surfaces*. Ecological Modelling, 2004. 177(3-4): p. 415-426.
54. Prieto, B., et al., *Colonization by Lichens of Granite Dolmens in Galicia (Nw Spain)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1994. 34(1): p. 47-&.
55. Prieto Lamas, B., M.T. Rivas Brea, and B.M. Silva Hermo, *Colonization by lichens of granite churches in Galicia (northwest Spain)*. Science of the Total Environment, 1995. 167(1-3): p. 343-351.
56. Wierzchos, J. and C. Ascaso, *Application of back-scattered electron imaging to the study of the lichen-rock interface*. Journal of Microscopy, 1994. 175(1): p. 54-59.
57. Ascaso, C. and J. Wierzchos, *Morphological and Chemical Features of Bioweathered Granitic Biotite Induced by Lichen Activity*. Clays and Clay Minerals, 1996. 44: p. 652-657.
58. Sterflinger, K. and W.E. Krumbein, *Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones*. Geomicrobiology Journal, 1997. 14(3): p. 219-&.
59. Seaward, M.R.D., et al., *The role of lichens in the biodeterioration of ancient monuments with particular reference to central Italy*. International Biodeterioration, 1989. 25(1-3): p. 49-55.
60. Ascaso, C. and J. Wierzchos, *Structural Aspects of the Lichen-Rock Interface Using Back-scattered Electron Imaging*. Botanica Acta, 1994. 107(4): p. 251-256.
61. Barnum, D.W., *Hydrolysis of cations. Formation constants and standard free energies of formation of hydroxy complexes*. Inorganic Chemistry, 1983. 22(16): p. 2297-2305.
62. Casey, W.H. and B. Bunker, *Leaching of mineral and glass surfaces during dissolution*. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 1990. 23(1): p. 397-426.
63. Atkins, P. and J. De Paula, *Physical Chemistry* 2006: Oxford University Press.
64. White, A.F., *Quantitative Approaches to Characterizing Natural Chemical Weathering Rates*, in *Kinetics of Water-Rock Interaction*, S.L. Brantley, J.D. Kubicki, and A.F. White, Editors. 2008, Springer New York. p. 469-543.
65. Oelkers, E.H., *General kinetic description of multioxide silicate mineral and glass dissolution*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2001. 65(21): p. 3703-3719.
66. Petit, J.C., et al., *Hydrated-layer formation during dissolution of complex silicate glasses and minerals*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 1990. 54(7): p. 1941-1955.

67. Luther III, G.W., et al., *Pyrite and oxidized iron mineral phases formed from pyrite oxidation in salt marsh and estuarine sediments*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1982. 46(12): p. 2665-2669.
68. Junta, J.L. and M.F. Hochella Jr, *Manganese (II) oxidation at mineral surfaces: A microscopic and spectroscopic study*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1994. 58(22): p. 4985-4999.
69. Moses, C.O., et al., *Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1987. 51(6): p. 1561-1571.
70. Huber, N.K. and R.M. Garrels, *Relation of pH and oxidation potential to sedimentary iron mineral formation*. *Economic Geology*, 1953. 48(5): p. 337-357.
71. Bosbach, D., C. Hall, and A. Putnis, *Mineral precipitation and dissolution in aqueous solution: in-situ microscopic observations on barite (001) with atomic force microscopy*. *Chemical Geology*, 1998. 151(1-4): p. 143-160.
72. Abdulla, H., *Bioweathering and Biotransformation of Granitic Rock Minerals by Actinomycetes*. *Microbial Ecology*, 2009. 58(4): p. 753-761.
73. Landeweert, R., et al., *Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals*. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001. 16(5): p. 248-254.
74. BÜDel, B., et al., *Reshaping of sandstone surfaces by cryptoendolithic cyanobacteria: bioalkalization causes chemical weathering in arid landscapes*. *Geobiology*, 2004. 2(4): p. 261-268.
75. Madigan, M., et al., *Brock Biology of Microorganisms (13th Edition)* 2010: Benjamin Cummings.
76. Hirschler, A., J. Lucas, and J.-C. Hubert, *Bacterial involvement in apatite genesis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990. 73(3): p. 211-220.
77. Hirschler, A., J. Lucas, and J.C. Hubert, *Apatite genesis: A biologically induced or biologically controlled mineral formation process?* *Geomicrobiology Journal*, 1990. 8(1): p. 47-56.
78. Chave, K.E., S.V. Smith, and K.J. Roy, *Carbonate production by coral reefs*. *Marine Geology*, 1972. 12(2): p. 123-140.
79. Weiner, S., *Biomining: A structural perspective*. *Journal of Structural Biology*, 2008. 163(3): p. 229-234.
80. Wilt, F.H., *Developmental biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures*. *Developmental Biology*, 2005. 280(1): p. 15-25.
81. Bonneville, S., et al., *Tree-mycorrhiza symbiosis accelerate mineral weathering: Evidences from nanometer-scale elemental fluxes at the hypha-mineral interface*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2011. 75(22): p. 6988-7005.
82. Brunner, I., et al., *Pioneering fungi from the Damma glacier forefield in the Swiss Alps can promote granite weathering*. *Geobiology*, 2011. 9(3): p. 266-279.
83. Davis, K.J., K.H. Nealson, and A. Luttge, *Calcite and dolomite dissolution rates in the context of microbe-mineral surface interactions*. *Geobiology*, 2007. 5(2): p. 191-205.

84. Matlakowska, R., A. Sklodowska, and K. Nejbert, *Bioweathering of Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine*. *Fems Microbiology Ecology*, 2012. 81(1): p. 99-110.
85. Olsson-Francis, K., et al., *The effect of rock composition on cyanobacterial weathering of crystalline basalt and rhyolite*. *Geobiology*, 2012. 10(5): p. 434-444.
86. Brehm, U., A. Gorbushina, and D. Mottershead, *The role of microorganisms and biofilms in the breakdown and dissolution of quartz and glass*. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 2005. 219(1-2): p. 117-129.
87. Moulton, K.L., J. West, and R.A. Berner, *Solute flux and mineral mass balance approaches to the quantification of plant effects on silicate weathering*. *American Journal of Science*, 2000. 300(7): p. 539-570.
88. De Los Rios, A., V. Galvan, and C. Ascaso, *In situ microscopical diagnosis of biodeterioration processes at the convent of Santa Cruz la Real, Segovia, Spain*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004. 54(2-3): p. 113-120.
89. Eggert, F., *Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse* 2005: Books on Demand.
90. Olesik, J.W., *Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP/MS*. *Anal Chem*, 1991. 63(1): p. 12A-21A.
91. Jeffery, P.G. and D. Hutchison, *CHAPTER 2 - Sample Decomposition*, in *Chemical Methods of Rock Analysis (Third Edition)*, P.G. Jeffery and D. Hutchison, Editors. 1981, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 18-28.
92. Filgueiras, A.V., I. Lavilla, and C. Bendicho, *Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples*. *Journal of Environmental Monitoring*, 2002. 4(6): p. 823-857.
93. Govindaraju, K. and G. Mevelle, *Fully automated dissolution and separation methods for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry rock analysis. Application to the determination of rare earth elements. Plenary lecture*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1987. 2(6): p. 615-621.
94. Nadkarni, R.A., *Applications of microwave oven sample dissolution in analysis*. *Anal Chem*, 1984. 56(12): p. 2233-2237.
95. Zhang, W., et al., *Reassessment of HF/HNO<sub>3</sub> Decomposition Capability in the High-Pressure Digestion of Felsic Rocks for Multi-Element Determination by ICP-MS*. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 2012: p. no-no.
96. Brantley, S.L., *5.03 - Reaction Kinetics of Primary Rock-forming Minerals under Ambient Conditions*, in *Treatise on Geochemistry*, H.D. Holland and K.K. Turekian, Editors. 2003, Pergamon: Oxford. p. 73-117.
97. White, A.F. and S.L. Brantley, *The effect of time on the weathering of silicate minerals: why do weathering rates differ in the laboratory and field?* *Chemical Geology*, 2003. 202(3-4): p. 479-506.

98. Arvidson, R.S., et al., *Variation in calcite dissolution rates: A fundamental problem?* *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2003. 67(9): p. 1623-1634.
99. Lüttge, A., *Crystal dissolution kinetics and Gibbs free energy*. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2006. 150(2–3): p. 248-259.
100. Price, J.R. and M.A. Velbel, *Chemical weathering indices applied to weathering profiles developed on heterogeneous felsic metamorphic parent rocks*. *Chemical Geology*, 2003. 202(3–4): p. 397-416.
101. Takahashi, F. and T. Shimaoka, *The weathering of municipal solid waste incineration bottom ash evaluated by some weathering indices for natural rock*. *Waste Management*, 2012. 32(12): p. 2294-2305.
102. Anderson, D.H. and H.E. Hawkes, *Relative mobility of the common elements in weathering of some schist and granite areas*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1958. 14(3): p. 204-210.
103. Parker, A., *An Index of Weathering for Silicate Rocks*. *Geological Magazine*, 1970. 107(06): p. 501-504.
104. Nesbitt, H.W. and G.M. Young, *Early Proterozoic climates and plate motions inferred from major element chemistry of lutites*. *Nature*, 1982. 299(5885): p. 715-717.
105. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*. *Annu Rev Microbiol*, 2000. 54: p. 49-79.
106. Davey, M.E. and G.A. O'toole, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000. 64(4): p. 847-+.
107. Watnick, P. and R. Kolter, *Biofilm, City of Microbes*. *Journal of Bacteriology*, 2000. 182(10): p. 2675-2679.
108. Flemming, H.C., T.R. Neu, and D.J. Wozniak, *The EPS matrix: The "House of Biofilm cells"*. *Journal of Bacteriology*, 2007. 189(22): p. 7945-7947.
109. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8(9): p. 623-633.
110. Hu, W., et al., *DNA Builds and Strengthens the Extracellular Matrix in Myxococcus xanthus Biofilms by Interacting with Exopolysaccharides*. *Plos One*, 2012. 7(12).
111. Sahu, P.K., et al., *Characterization of eDNA from the Clinical Strain Acinetobacter baumannii AIIMS 7 and Its Role in Biofilm Formation*. *Scientific World Journal*, 2012: p. 1-10.
112. Knowles, E.J. and R.W. Castenholz, *Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms*. *Fems Microbiology Ecology*, 2008. 66(2): p. 261-270.
113. Tamaru, Y., et al., *Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. 71(11): p. 7327-7333.

114. Ozturk, S. and B. Aslim, *Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress*. Environmental Science and Pollution Research, 2010. 17(3): p. 595-602.
115. Hill, D., et al., *Extracellular polysaccharide of Nostoc commune (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation*. Journal of Applied Phycology, 1997. 9(3): p. 237-248.
116. Jenkins, K.A. and B.J. Smith, *Daytime rock surface temperature variability and its implications for mechanical rock weathering: Tenerife, Canary Islands*. Catena, 1990. 17(4-5): p. 449-459.
117. Hill, H.Z., *The Function of Melanin or 6 Blind People Examine an Elephant*. Bioessays, 1992. 14(1): p. 49-56.
118. Potts, M., *Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria*. European Journal of Phycology, 1999. 34(4): p. 319-328.
119. Decho, A., *Exopolymer Microdomains as a Structuring Agent for Heterogeneity Within Microbial Biofilms*, in *Microbial Sediments*, R. Riding and S. Awramik, Editors. 2000, Springer Berlin Heidelberg. p. 9-15.
120. Gaylarde, C.C., P.M. Gaylarde, and B.A. Neilan, *Endolithic Phototrophs in Built and Natural Stone*. Current Microbiology, 2012. 65(2): p. 183-188.
121. Walker, J.J. and N.R. Pace, *Endolithic Microbial Ecosystems*. Annu Rev Microbiol, 2007. 61(1): p. 331-347.
122. FRIEDMANN, E.I. and R. OCAMPO, *Endolithic Blue-Green Algae in the Dry Valleys: Primary Producers in the Antarctic Desert Ecosystem*. Science, 1976. 193(4259): p. 1247-1249.
123. Eppard, M., et al., *Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surfaces*. Arch Microbiol, 1996. 166(1): p. 12-22.
124. Staley, J.T., F. Palmer, and J.B. Adams, *Microcolonial Fungi - Common Inhabitants on Desert Rocks*. Science, 1982. 215(4536): p. 1093-1095.
125. Gorbushina, A., *Microcolonial fungi: survival potential of terrestrial vegetative structures*. Astrobiology, 2003. 3(3): p. 543-54.
126. Cockell, C.S. and J. Knowland, *Ultraviolet radiation screening compounds*. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 1999. 74(3): p. 311-345.
127. Garciapichel, F., N.D. Sherry, and R.W. Castenholz, *Evidence for an Ultraviolet Sunscreen Role of the Extracellular Pigment Scytonemin in the Terrestrial Cyanobacterium Chlorogloeopsis Sp.* Photochemistry and Photobiology, 1992. 56(1): p. 17-23.
128. Volkmann, M. and A.A. Gorbushina, *A broadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like amino acids of terrestrial, marine and freshwater origin*. FEMS Microbiol Lett, 2006. 255(2): p. 286-95.

129. Ehling-Schulz, M., W. Bilger, and S. Scherer, *UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology*, 1997. 179(6): p. 1940-1945.
130. Butler, M.J. and A.W. Day, *Fungal melanins: a review*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998. 44(12): p. 1115-1136.
131. Monier, J.M. and S.E. Lindow, *Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces*. *Microbial Ecology*, 2005. 49(3): p. 343-352.
132. Kemmling, A., et al., *Biofilms and extracellular matrices on geomaterials*. *Environmental Geology*, 2004. 46(3-4): p. 429-435.
133. Albertano, P. and C. Urzì, *Structural Interactions among Epilithic Cyanobacteria and Heterotrophic Microorganisms in Roman Hypogea*. *Microbial Ecology*, 1999. 38(3): p. 244-252.
134. Gorbushina, A. and W. Krumbein, *Rock Dwelling Fungal Communities: Diversity of Life Styles and Colony Structure*, in *Journey to Diverse Microbial Worlds*, J. Seckbach, Editor 2000, Springer Netherlands. p. 317-334.
135. Viles, H.A. and A.A. Gorbushina, *Soiling and microbial colonisation on urban roadside limestone: a three year study in Oxford, England*. *Building and Environment*, 2003. 38(9-10): p. 1217-1224.
136. Sterflinger, K., *Temperature and NaCl- tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1998. 74(4): p. 271-281.
137. Satow, M.M., et al., *Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment*. *Stud Mycol*, 2008(61): p. 157-163.
138. Cene, G., M. Lucia, and G. Martin, *Polyextremotolerant black fungi: oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses*. *Frontiers in Microbiology*, 2012. 3.
139. Palmer, F.E., et al., *SURVIVAL AND GROWTH OF MICROCOLONIAL ROCK FUNGI AS AFFECTED BY TEMPERATURE AND HUMIDITY*. *New Phytologist*, 1987. 107(1): p. 155-162.
140. McKay, C.P., J.L. Molaro, and M.M. Marinova, *High-frequency rock temperature data from hyper-arid desert environments in the Atacama and the Antarctic Dry Valleys and implications for rock weathering*. *Geomorphology*, 2009. 110(3-4): p. 182-187.
141. Gorbushina, A.A., E.R. Kotlova, and O.A. Sherstneva, *Cellular responses of microcolonial rock fungi to long-term desiccation and subsequent rehydration*. *Stud Mycol*, 2008. 61: p. 91-7.
142. Gorbushina, A.A., et al., *Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock-dwelling microcolonial fungi*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 2003. 81(2): p. 131-138.
143. Sterflinger, K., et al., *Coniosporium perforans and C-apolinis, two new rock-inhabiting fungi isolated from marble in the Sanctuary of Delos (Cyclades, Greece)*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1997. 72(4): p. 349-363.

144. Wollenzien, U., et al., *On the Isolation of Microcolonial Fungi Occurring on and in Marble and Other Calcareous Rocks*. Science of the Total Environment, 1995. 167: p. 287-294.
145. Sterflinger, K. and H. Prillinger, *Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria)*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2001. 80(3-4): p. 275-286.
146. Nishimura, K. and M. Miyaji, *Studies on a Saprophyte of Exophiala-Dermatitidis Isolated from a Humidifier*. Mycopathologia, 1982. 77(3): p. 173-181.
147. Nishimura, K., et al., *Fungi in Bathwater and Sludge of Bathroom Drainpipes .1. Frequent Isolation of Exophiala Species*. Mycopathologia, 1987. 97(1): p. 17-23.
148. Gorbushina, A.A. and W.J. Broughton, *Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem*. Annu Rev Microbiol, 2009. 63: p. 431-50.
149. Stanier, R. and G. Bazine, *Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria*. Annual Reviews in Microbiology, 1977. 31(1): p. 225-274.
150. Brocks, J.J., et al., *Archean Molecular Fossils and the Early Rise of Eukaryotes*. Science, 1999. 285(5430): p. 1033-1036.
151. Canfield, D.E., *THE EARLY HISTORY OF ATMOSPHERIC OXYGEN: Homage to Robert M. Garrels*. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2005. 33(1): p. 1-36.
152. McFadden, G.I., *PRIMARY AND SECONDARY ENDOSYMBIOSIS AND THE ORIGIN OF PLASTIDS*. Journal of Phycology, 2001. 37(6): p. 951-959.
153. Toepel, J., et al., *Differential transcriptional analysis of the cyanobacterium Cyanothece sp strain ATCC 51142 during light-dark and continuous-light growth*. Journal of Bacteriology, 2008. 190(11): p. 3904-3913.
154. Stal, L.J. and W.E. Krumbein, *Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium Oscillatoria sp*. Arch Microbiol, 1987. 149(1): p. 76-80.
155. Kumar, K., R.A. Mella-Herrera, and J.W. Golden, *Cyanobacterial Heterocysts*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. 2(4).
156. SUTHERLAND, J.M., M. HERDMAN, and W.D.P. STEWART, *Akinetes of the Cyanobacterium Nostoc PCC 7524: Macromolecular Composition, Structure and Control of Differentiation*. Journal of General Microbiology, 1979. 115(2): p. 273-287.
157. Mateo, P., et al., *Life cycle as a stable trait in the evaluation of diversity of Nostoc from biofilms in rivers*. Fems Microbiology Ecology, 2011. 76(2): p. 185-198.
158. Singh, S.C., R.P. Sinha, and D.P. Hader, *Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria*. Acta Protozoologica, 2002. 41(4): p. 297-308.
159. Dadheech, N., *Desiccation tolerance in cyanobacteria*. African Journal of Microbiology Research, 2010. 4(15): p. 1584-1593.

160. Allakhverdiev, S.I., et al., *Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt-induced damage in Synechococcus*. *Plant Physiology*, 2001. 125(4): p. 1842-1853.
161. De Philippis, R., et al., *Assessment of the potential of Nostoc strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest*. *Journal of Applied Phycology*, 2000. 12(3-5): p. 401-407.
162. Atkins, E., *Biomolecular structures of naturally occurring carbohydrate polymers*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1986. 8(6): p. 323-329.
163. Riding, R., *Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial–algal mats and biofilms*. *Sedimentology*, 2000. 47: p. 179-214.
164. Khodadad, C.L.M. and J.S. Foster, *Metagenomic and Metabolic Profiling of Nonlithifying and Lithifying Stromatolitic Mats of Highborne Cay, The Bahamas*. *Plos One*, 2012. 7(5): p. e38229.
165. Bosak, T., et al., *Morphological record of oxygenic photosynthesis in conical stromatolites*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(27): p. 10939-10943.
166. Riding, R., *The term stromatolite: towards an essential definition*. *Lethaia*, 1999. 32(4): p. 321-330.
167. Allwood, A.C., et al., *Controls on development and diversity of Early Archean stromatolites*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(24): p. 9548-9555.
168. Dupraz, C. and P.T. Visscher, *Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats*. *Trends in Microbiology*, 2005. 13(9): p. 429-438.
169. Kalkowsky, E., *Oolith und Stromatolith im norddeutschen Buntsandstein*. *Zeitschrift der Deutschen Geologischen Gesellschaft*, 1908. 60: p. 68-125.
170. Dvornyk, V. and E. Nevo, *Genetic polymorphism of cyanobacteria under permanent natural stress: A lesson from the "Evolution Canyons"*. *Research in Microbiology*, 2003. 154(2): p. 79-84.
171. Ortega-Calvo, J.J., et al., *Factors Affecting the Weathering and Colonization of Monuments by Phototrophic Microorganisms*. *Science of the Total Environment*, 1995. 167: p. 329-341.
172. Steinberg, N.A. and J.C. Meeks, *Physiological Sources of Reductant for Nitrogen-Fixation Activity in Nostoc-Sp Strain Ucd 7801 in Symbiotic Association with Anthoceros-Punctatus*. *Journal of Bacteriology*, 1991. 173(22): p. 7324-7329.
173. Meeks, J.C., et al., *An overview of the genome of Nostoc punctiforme, a multicellular, symbiotic cyanobacterium*. *Photosynthesis Research*, 2001. 70(1): p. 85-106.
174. Wollenzien, U., et al., *Sarcinomyces petricola, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1997. 71(3): p. 281-288.
175. Meeks, J.C., et al., *Cellular differentiation in the cyanobacterium Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol*, 2002. 178(6): p. 395-403.

176. Campbell, E.L. and J.C. Meeks, *Characteristics of Hormogonia Formation by Symbiotic-Nostoc Spp in Response to the Presence of Anthoceros-Punctatus or Its Extracellular Products*. Applied and Environmental Microbiology, 1989. 55(1): p. 125-131.
177. Cohen, M.F. and J.C. Meeks, *A hormogonium regulating locus, hrmUA, of the cyanobacterium Nostoc punctiforme strain ATCC 29133 and its response to an extract of a symbiotic plant partner Anthoceros punctatus*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997. 10(2): p. 280-289.
178. Knight, C.D. and D.G. Adams, *A method for studying chemotaxis in nitrogen fixing cyanobacterium-plant symbioses*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996. 49(2): p. 73-77.
179. Nai, C., et al., *Nutritional physiology of a rock-inhabiting, model micro-colonial fungus from an ancestral lineage of the Chaetothyriales (Ascomycetes)*. Fungal Genet Biol, 2013.
180. Volkmann, M., et al., *Mycosporine-glutamicol-glucoside: a natural UV-absorbing secondary metabolite of rock-inhabiting microcolonial fungi*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. 17(9): p. 897-902.
181. Grimm W.D., Bildatlas wichtiger Denkmalgesteine der Bundesrepublik Deutschland. Hrsg. vom Bayerischen Landesamt für Denkmalpflege, Lipp-Verlag, München 1990, ISBN 3-87490-535-7.
182. Füchtbauer H., Sedimente und Sedimentgesteine, Schweizerbart Verlag, Stuttgart 1988, ISBN 978-3-510-65138-2
183. Lorenz H.G., Das Verwitterungsverhalten des Kalksteins Savonnières-Oolith, Stoneplus, 1998, ISSN 1434-4378.
184. Stanier, R.Y., et al., *Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Cchroococcales)*. Bacteriological Reviews, 1971. 35(2): p. 171-&.
185. Meeks, J.C. and Castenho.Rw, *Growth and Photosynthesis in an Extreme Thermophile, Synechococcus-Lividus (Cyanophyta)*. Archiv Fur Mikrobiologie, 1971. 78(1): p. 25-&.
186. Cohen, M.F., et al., *Transposon mutagenesis of Nostoc sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives*. Microbiology, 1994. 140 ( Pt 12): p. 3233-40.
187. Griffiths, R.I., et al., *Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. 66(12): p. 5488-5491.
188. Bates, S.T. and F. Garcia-Pichel, *A culture-independent study of free-living fungi in biological soil crusts of the Colorado Plateau: their diversity and relative contribution to microbial biomass*. Environ Microbiol, 2009. 11(1): p. 56-67.
189. Sherwood, A.R. and G.G. Presting, *Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria*. Journal of Phycology, 2007. 43(3): p. 605-608.
190. Hesse, W., *Die Petri'sche Doppelschale als feuchte Kammer*. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 1896. 23(1): p. 147-148.

191. Galelli, A. and P. Truffabachi, *Urtica-Dioica Agglutinin - a Superantigenic Lectin from Stinging Nettle Rhizome*. *Journal of Immunology*, 1993. 151(4): p. 1821-1831.
192. Mazzetti, S., et al., *Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system*. *European Journal of Histochemistry*, 2004. 48(4): p. 423-428.
193. Fujihashi, M., et al., *Crystal structure of fucose-specific lectin from Aleuria aurantia binding ligands at three of its five sugar recognition sites*. *Biochemistry*, 2003. 42(38): p. 11093-11099.
194. Choi, A.H.C. and D.H. Oday, *Calcofluor Staining of Cellulose during Microcyst Differentiation in Wild-Type and Mutant Strains of Polysphondylium-Pallidum*. *Journal of Bacteriology*, 1984. 157(1): p. 291-296.
195. Harringt.Bj and K.B. Raper, *Use of Fluorescent Brightener to Demonstrate Cellulose in Cellular Slime Molds*. *Applied Microbiology*, 1968. 16(1): p. 106-&.
196. Zippel, B. and T.R. Neu, *Characterization of Glycoconjugates of Extracellular Polymeric Substances in Tufa-Associated Biofilms by Using Fluorescence Lectin-Binding Analysis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(2): p. 505-516.
197. Pan, X.L., et al., *A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy*. *Water Sa*, 2010. 36(1): p. 111-116.
198. Al-Halbouni, D., W. Dott, and J. Hollender, *Occurrence and composition of extracellular lipids and polysaccharides in a full-scale membrane bioreactor*. *Water Research*, 2009. 43(1): p. 97-106.
199. Wasserwesen, D.I.f.N.N., *Elution von Feststoffen - Perkolationsverfahren zur gemeinsamen Untersuchung des Elutionsverhaltens von anorganischen und organischen Stoffen*2009: Beuth.
200. Fiantis, D., et al., *Determination of the Geochemical Weathering Indices and Trace Elements Content of New Volcanic Ash Deposits from Mt. Talang (West Sumatra) Indonesia*. *Eurasian Soil Science*, 2010. 43(13): p. 1477-1485.
201. Fagerlund, G., *Determination of specific surface by the BET method*. *Matériaux et Construction*, 1973. 6(3): p. 239-245.
202. Lankadurai, B.P., E.G. Nagato, and M.J. Simpson, *Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors*. *Environmental Reviews*, 2013. 21(3): p. 180-205.
203. Adams, D., et al., *Cyanobacterial-Plant Symbioses*, in *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, et al., Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 359-400.
204. Campbell, E.L., et al., *Global Gene Expression Patterns of Nostoc punctiforme in Steady-State Dinitrogen-Grown Heterocyst-Containing Cultures and at Single Time Points during the Differentiation of Akinetes and Hormogonia*. *Journal of Bacteriology*, 2007. 189(14): p. 5247-5256.

205. Clark, C. and E.L. Schmidt, *Effect of Mixed Culture on Nitrosomonas europaea Simulated by Uptake and Utilization of Pyruvate*. Journal of Bacteriology, 1966. 91(1): p. 367-373.
206. Monod, J., *The Growth of Bacterial Cultures*. Annu Rev Microbiol, 1949. 3(1): p. 371-394.
207. Vilhauer, L., et al., *The exo-proteome and exo-metabolome of Nostoc punctiforme (Cyanobacteria) in the presence and absence of nitrate*. Arch Microbiol, 2014: p. 1-11.
208. Dissertation Corrado Nai
209. Gomez-Cornelio, S., et al., *Succession of fungi colonizing porous and compact limestone exposed to subtropical environments*. Fungal Biology, 2012. 116(10): p. 1064-1072.
210. Miller, A.Z., et al., *Bioreceptivity of building stones: A review*. Science of the Total Environment, 2012. 426: p. 1-12.
211. Miller, A.Z., et al., *Primary bioreceptivity of limestones used in southern European monuments*. Geological Society, London, Special Publications, 2010. 331(1): p. 79-92.
212. Ayerst, G., *The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi*. Journal of Stored Products Research, 1969. 5(2): p. 127-141.
213. Tiano, P., P. Accolla, and L. Tomaselli, *Phototrophic biodeteriogens on lithoid surfaces: An ecological study*. Microbial Ecology, 1995. 29(3): p. 299-309.
214. Lasaga, A.C., et al., *Chemical-Weathering Rate Laws and Global Geochemical Cycles*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 1994. 58(10): p. 2361-2386.
215. Exley, C., *Silicon in life: A bioinorganic solution to bioorganic essentiality*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1998. 69(3): p. 139-144.
216. Cubillas, P., et al., *Experimental determination of the dissolution rates of calcite, aragonite, and bivalves*. Chemical Geology, 2005. 216(1-2): p. 59-77.
217. Kraus, P.R. and J. Heitman, *Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. 311(4): p. 1151-1157.
218. Norris, V., et al., *Calcium in bacteria: a solution to which problem?* Molecular Microbiology, 1991. 5(4): p. 775-778.
219. de los Rios, A., et al., *Deteriorating effects of lichen and microbial colonization of carbonate building rocks in the Romanesque churches of Segovia (Spain)*. Science of the Total Environment, 2009. 407(3): p. 1123-1134.
220. Flemming, H.C., *The perfect slime*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2011. 86(2): p. 251-259.
221. Komanoya, T., et al., *Simultaneous formation of sorbitol and gluconic acid from cellobiose using carbon-supported ruthenium catalysts*. Journal of Energy Chemistry, 2013. 22(2): p. 290-295.

222. Brands, C.M.J. and M.A.J.S. van Boekel, *Reactions of Monosaccharides during Heating of Sugar–Casein Systems: Building of a Reaction Network Model*. J Agric Food Chem, 2001. 49(10): p. 4667-4675.
223. Sievers, C., et al., *Acid-Catalyzed Conversion of Sugars and Furfurals in an Ionic-Liquid Phase*. ChemSusChem, 2009. 2(7): p. 665-671.
224. Schulien, S., *Chloritisierung synthetischer Biotite*. Naturwissenschaften, 1974. 61(12): p. 681-682.
225. Kay, A., *Detecting and minimizing zinc contamination in physiological solutions*. BMC Physiology, 2004. 4(1): p. 4.
226. Gao, K., *Chinese studies on the edible blue-green alga, Nostoc flagelliforme: a review*. Journal of Applied Phycology, 1998. 10(1): p. 37-49.
227. Tashpulatov, Z., B.G. Baibaev, and T.S. Shul'man, *Chemical Composition of Mycelium of the Thermotolerant Fungus Penicillium atrovenetum*. Chemistry of Natural Compounds, 2000. 36(5): p. 518-520.
228. Phillips, R., J. Kondev, and J. Theriot, *Physical biology of the cell* 2009: Garland Science.
229. Wallander, H., L. Johansson, and J. Pallon, *PIXE analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different minerals in forest soil*. Fems Microbiology Ecology, 2002. 39(2): p. 147-156.
230. Wallander, H., et al., *Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR–RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil*. Fems Microbiology Ecology, 2003. 44(1): p. 57-65.
231. Epstein, W., *The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria*, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2003, Academic Press. p. 293-320.
232. Cowan, J.A., *Metallobiochemistry of Magnesium - Coordination-Complexes with Biological Substrates - Site Specificity, Kinetics and Thermodynamics of Binding, and Implications for Activity*. Inorganic Chemistry, 1991. 30(13): p. 2740-2747.
233. Cowan, J.A., *Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes*. Biometals, 2002. 15(3): p. 225-235.
234. Li, Y.-H., *Why are the chemical compositions of living organisms so similar?* Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie, 1984. 46(2): p. 177-184.
235. Wilcox, D.E., *Binuclear metallohydrolases*. Chemical Reviews, 1996. 96(7): p. 2435-2458.
236. Black, C.B., H.W. Huang, and J.A. Cowan, *Biological Coordination Chemistry of Magnesium, Sodium, and Potassium-Ions - Protein and Nucleotide-Binding Sites*. Coordination Chemistry Reviews, 1994. 135: p. 165-202.
237. Huang, W.H. and W.C. Kiang, *Laboratory Dissolution of Plagioclase Feldspars in Water and Organic-Acids at Room-Temperature*. American Mineralogist, 1972. 57(11-1): p. 1849-1859.
238. Oxburgh, R., J.I. Drever, and Y.-T. Sun, *Mechanism of plagioclase dissolution in acid solution at 25°C*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 1994. 58(2): p. 661-669.

239. Liermann, L.J., et al., *Microenvironments of pH in biofilms grown on dissolving silicate surfaces*. *Chemical Geology*, 2000. 171(1-2): p. 1-16.
240. Bissett, A., et al., *Metabolic Microenvironmental Control by Photosynthetic Biofilms under Changing Macroenvironmental Temperature and pH Conditions*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. 74(20): p. 6306-6312.
241. de los Rios, A., et al., *Acid microenvironments in microbial biofilms of Antarctic endolithic microecosystems*. *Environ Microbiol*, 2003. 5(4): p. 231-237.
242. Collins, L., *Replacement of primary plagioclase by secondary K-feldspar and myrmekite: Myrmekite, ISSN 1526-5757, electronic Internet publication, no. 2, 1997*.
243. Gerald, J.D.F. and A.C. McLaren, *The microstructures of microcline from some granitic rocks and pegmatites*. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 1982. 80(3): p. 219-229.
244. Hellmann, R., et al., *Unifying natural and laboratory chemical weathering with interfacial dissolution–reprecipitation: A study based on the nanometer-scale chemistry of fluid–silicate interfaces*. *Chemical Geology*, 2012. 294–295(0): p. 203-216.
245. ten Berge, H.F.M., et al., *Olivine Weathering in Soil, and Its Effects on Growth and Nutrient Uptake in Ryegrass (Lolium perenne L.): A Pot Experiment*. *Plos One*, 2012. 7(8).
246. Macomber, L. and R.P. Hausinger, *Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms*. *Metallomics*, 2011. 3(11): p. 1153-1162.
247. Krauskopf, K.B., *Introduction to geochemistry*. 3rd ed. ed, ed. D.K. Bird 1995, New York :: McGraw-Hill.
248. Bennett, P.C., F.K. Hiebert, and J.R. Rogers, *Microbial control of mineral–groundwater equilibria: Macroscale to microscale*. *Hydrogeology Journal*, 2000. 8(1): p. 47-62.
249. Anthony, J., et al., *Handbook of Mineralogy (Mineralogical Society of America, Chantilly, VA)*, 2001.
250. Wogelius, R.A. and J.V. Walther, *Olivine dissolution at 25°C: Effects of pH, CO<sub>2</sub>, and organic acids*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1991. 55(4): p. 943-954.
251. Golubev, S.V., O.S. Pokrovsky, and J. Schott, *Experimental determination of the effect of dissolved CO<sub>2</sub> on the dissolution kinetics of Mg and Ca silicates at 25 °C*. *Chemical Geology*, 2005. 217(3–4): p. 227-238.
252. Rosso, J.J. and J.D. Rimstidt, *A high resolution study of forsterite dissolution rates*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2000. 64(5): p. 797-811.
253. Grandstaff, D.E., *Changes in surface area and morphology and the mechanism of forsterite dissolution*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1978. 42(12): p. 1899-1901.
254. Blum, L.A., *Role of surface speciation in the low-temperature dissolution of minerals*. *Nature*, 1988. 331(6155): p. 431-433.
255. Luce, R.W., R.W. Bartlett, and G.A. Parks, *Dissolution kinetics of magnesium silicates*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1972. 36(1): p. 35-50.

256. Siegesmund, S., J. Ruedrich, and A. Koch, *Marble bowing: comparative studies of three different public building facades*. *Environmental Geology*, 2008. 56(3-4): p. 473-494.
257. Smits, M.M., et al., *The fungal–mineral interface: challenges and considerations of micro-analytical developments*. *Fungal Biology Reviews*, 2009. 23(4): p. 122-131.
258. Martin, Y. and P. Vermette, *Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances*. *Biomaterials*, 2005. 26(35): p. 7481-7503.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AAL	Lektin isoliert aus <i>Aleuria aurantia</i>
Abb.	Abbildung
Al	Aluminium
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	Kaolinit
Ar	Argon
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
atm	Physikalische Atmosphäre (1 atm = 1013,15 Hektopascal)
A488	Alexa488 (fluoreszierender Farbstoff)
A568	Alexa568 (fluoreszierender Farbstoff)
B	Bor
Ba	Barium
BET-Oberfläche	gemessen nach <b>B</b> runauer, <b>E</b> mmett, <b>T</b> eller
BG11	Blue-Green Medium 11
BG11 <sub>0</sub>	BG11 ohne Stickstoffquelle
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius

Ca	Calcium
CaO	Calciumoxid
CBS	niederländisch <i>Centraal Bureau voor Schimmelcultures</i>
Chl a	Chlorophyll a
CIA	engl. <i>Chemical Index of Alteration</i>
Cl	Chlor
CLSM	engl. <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
cm	Zentimeter
Co	Cobalt
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cr	Chrom
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid (Cetyl=Hexadecyl)
Cu	Kupfer
d	Tag (engl. <i>day</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ESEM	engl. <i>Environmental Scanning Electron Microscope/y</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fe	Eisen
FeO	Eisen(II)-oxid
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Eisen(III)-oxid

Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Eisen(II,III)-oxid
g	Gramm
Gew. %	Gewichtsprozent
h	Stunde (engl. <i>hour</i> )
H <sup>+</sup>	Proton
HCl	Salzsäure
HF	Flusssäure
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Hz	Hertz
ICP-MS	engl. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	engl. <i>Inductively Coupled Optical Emission Spectroscopy</i>
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
<i>K. petricola</i>	<i>Knufia petricola</i>
K <sub>2</sub> O	Kaliumoxid
lat.	lateinisch
l	Liter
LEA	Lektin isoliert aus <i>Lycopersicon esculentum</i>
Li	Lithium
M	Meter
M	Molar (Mol/l)
μ	Mikro
MEA	engl. <i>malt extract agar</i>

MEB	engl. <i>malt extract broth</i>
Mg	Magnesium
µg	Mikrogramm
MgO	Magnesiumoxid
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Mn	Mangan
MnO	Manganoxid
MnO <sub>2</sub>	Mangandioxid
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl statistischer Replikate
N	Normal (Molar/z)
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na	Natrium
NaAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	Albit
NaCl	Natriumchlorid
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
Na <sub>2</sub> O	Natriumoxid
Nb	Niob
Ni	Nickel
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

nmol	Nanomol
<i>N. flagelliforme</i>	<i>Nostoc flagelliforme</i>
<i>N. punctiforme</i>	<i>Nostoc punctiforme</i>
Nr.	Nummer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH	Hydroxid
P	Phosphor
p.a.	lat. <i>per analysis</i>
<i>P. atrovenetum</i>	<i>Penicillium atrovenetum</i>
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
ppm	engl. <i>parts per million</i>
%	Prozent
PTFE	Polytetrafluorethylen
qPCR	quantitative PCR
Rb	Rubidium
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
S	Schwefel
SAB	subaerischer Biofilm
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Si	Silizium
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
Sr	Strontium

$\Sigma$	Summenzeichen
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Ti	Titan
TiO <sub>2</sub>	Titanoxid
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	Einheit (engl. <i>unit</i> ) der Enzymaktivität
UDA	Lektin isoliert aus <i>Urtica dioica</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.%	Volumenprozent
WIP	engl. <i>Weathering Index of Parker</i>
z	Äquivalentzahl (stöchiometrische Wertigkeit)
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
Zr	Zirkon
z.T.	zum Teil

## 6.2 Publikationen

### 6.2.1 Publikationen in Fachzeitschriften

Seiffert F, Bandow N, Bouchez J, von Blanckenburg F, Gorbushina AA, *Microbial colonization of bare rocks: laboratory biofilm enhances mineral weathering*, *Procedia Earth and Planetary Science* Vol.10C (2014) 123-129.

Seiffert F, Bandow N, Kalbe U, Milke R, Gorbushina AA (2014), *In vitro model rock biofilm growing in a percolation column: a laboratory tool to quantify biogenic granite dissolution*, in Vorbereitung zum Einreichen bei *Geobiology*.

### 6.2.2 Konferenzbeiträge

Seiffert F, Friedmann A, Heilmann A, Gorbushina AA, *Studying colonization of stone surfaces by a model biofilm in a flow-through chamber approach*, Posterpräsentation auf der Konferenz der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Tübingen, Deutschland (18-22/03/2012)

Seiffert F, Gorbushina AA, *Studying colonization of rock surfaces by a model biofilm in a flow-through chamber approach*, Vortrag auf dem Geobiologieseminar der Gordon Research Konferenzen in Ventura Beach, USA (26-27/01/2013)

Seiffert F, Neu T, Kuhlicke U, Toepel J, Gorbushina AA, *Studying colonization of rock surfaces by a model biofilm in a flow-through chamber approach*, Posterpräsentation auf der Geobiologiekonferenz der Gordon Research Konferenzen in Ventura Beach, USA (27/01-01/02/2013)

Noack-Schönmann S, Nai C, Seiffert F, Milke R, Gorbushina AA, *Microcolonial fungi: Suspended life at the air-rock interface*, Posterpräsentation auf der Konferenz "How dead is dead III" in Berlin, Deutschland (06-07/06/2013)

Seiffert F, Bandow N, Bouchez J, von Blanckenburg F, Gorbushina AA, *Microbial colonization of bare rocks: laboratory biofilm enhances mineral weathering*, Posterpräsentation auf der Konferenz "Geochemistry of the Earth's Surface 10 (GES10)" in Paris, Frankreich (18-22/08/2014)