

Symbiotische Lebensgemeinschaften

Flechten-Mikrobiom: eine alte Symbiose neu entdeckt

GABRIELE BERG¹, KATHARINA RIEDEL², MARTIN GRUBE³

¹ INSTITUT FÜR UMWELTBIOTECHNOLOGIE, TU GRAZ, ÖSTERREICH

² INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT GREIFSWALD

³ INSTITUT FÜR PFLANZENWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT GRAZ, ÖSTERREICH

Symbioses represent a frequent and successful lifestyle on Earth. Recently, bacterial communities were identified as stable, specific, and structurally integrated partners of the classical lichen symbiosis. We found that the diverse microbiota have the ability to contribute multiple aspects to the symbiotic system, including health, growth, and fitness. We developed a model of the symbiosis depicting the functional multi-player network of the participants, and argue that the strategy of functional diversification supports longevity of lichens under extreme conditions.

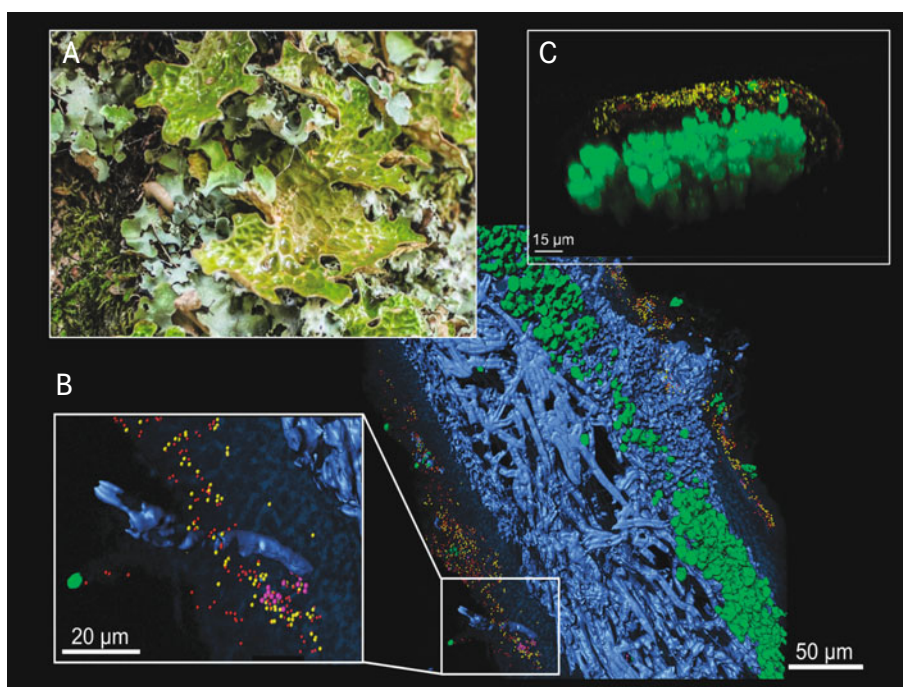
DOI: 10.1007/s12268-016-0648-5

© Springer-Verlag 2016

■ Flechten gelten als Symbiose im klassischen Sinn: Der symbiotische Lebensstil zwischen Pilzen und ihren phototrophen Partnern entstand bereits vor ca. 400 Millionen

Jahren im Devon und ist durch fossile Funde belegt. Ihr partnerschaftliches Dasein wurde nach der Entdeckung von De Bary im Jahr 1866 zwar zunächst zögerlich akzeptiert; Flechten sind aber nun in Biologielehrbüchern allgemein präsent. Pilze (Mykobionten) können mithilfe der beherbergten phototrophen Partner (Photobionten; Algen und Cyanobakterien) nahezu alle Standorte in terrestrischen Habitaten besiedeln. Besonders in kühlen und nährstoffarmen Gebieten können Flechten hohe Biomasse erzielen. Dennoch ist es erstaunlich, dass Flechten derart extreme Lebensräume nicht nur besiedeln können, sondern dass sie – etwa auf Gesteinsoberflächen – uralt werden können, denn von dort wurden bereits 1.000-jährige Flechten bestimmt. Bleiben die Bedingungen gleich, ist das Wachstum zwar langsam, aber potenziell unbegrenzt. Bei extremer Trockenheit ermöglicht Kryptobiose das Überleben sowie eine enorm schnelle Wiederbelebung bei ausreichender Feuchtigkeit. Flechten werden oft unterschätzt, haben jedoch wichtige ökologische Funktionen als (1) Erstbesiedler von Felsflächen, (2) Netzwerke gegen Bodenerosionen, (3) Kohlenstoff- und Stickstofffixierer an den Grenzen des Lebens und (4) als Lebensgrundlage für Tiere (von Protisten bis zu Rentieren). In der Forschung sind sie wichtige Modelle, um multimikrobielle Ökosysteme und ihre komplexen funktionellen Verflechtungen zu verstehen. Omics-Technologien lösten jüngst eine Revolution in der mikrobiellen Ökologie aus – sie ermöglichen erstmals die Öffnung der großen Mikrobiom-Schatzkiste und führen zu einem grundlegend neuen Verständnis von Eukaryoten, die nun, entsprechend dem Holobiontenkonzept, als Metaorganismen angesehen werden [1, 2].

Jede Flechte beherbergt ein hoch diverses und abundantes Mikrobiom (bis zu 10^{10} pro Gramm), das aus pro- und eukaryotischen Mikroorganismen besteht. Zunächst wurden Flechten-assoziierte Bakterien anhand traditioneller mikroskopischer Techniken als phototrophe Symbionten, aber auch als Kom-



▲ **Abb. 1:** Die Echte Lungenflechte *Lobaria pulmonaria* (L.) HOFFM. **A,** *Lobaria*-Thallus am Ahornstamm. **B,** Thallus-Querschnitt, aufgenommen mit konfokaler Laserscanmikroskopie (Pilz: blau, Algen: grün, Bakterien: durch unterschiedliche FISH-Sonden bunt). **C,** asexuell gebildete Verbreitungsorgane mit Mikrobiom.

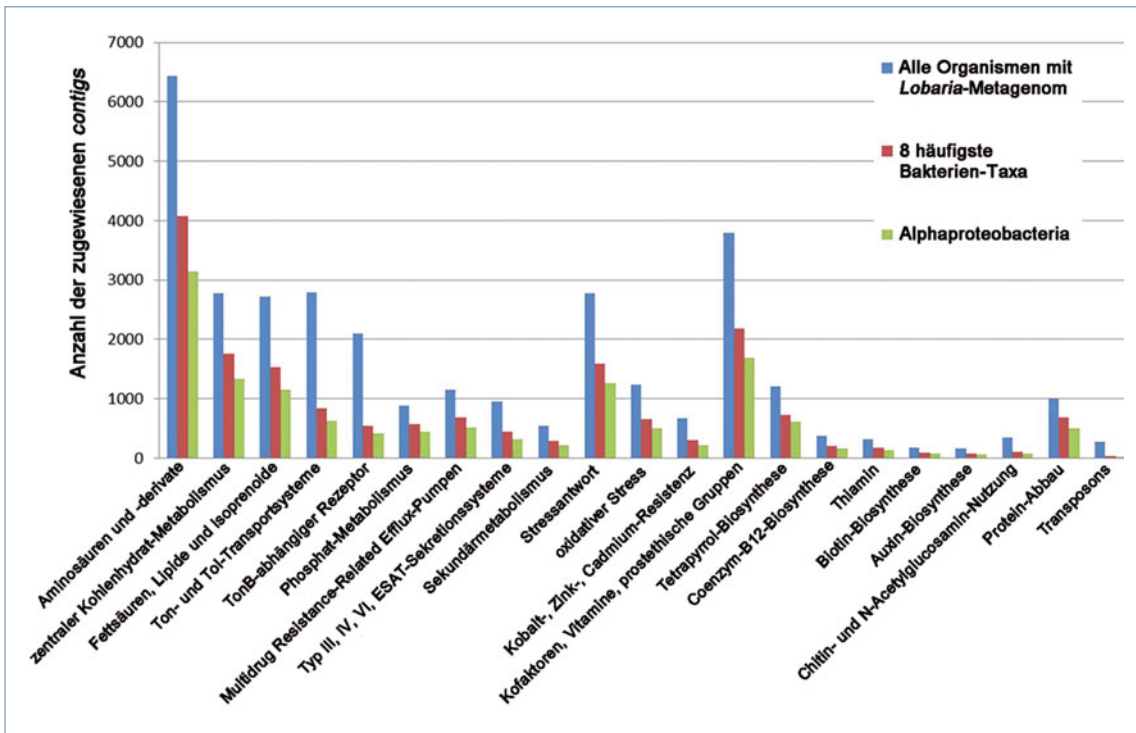
mensalen oder Kontaminanten eingestuft. Die Existenz eines eigenen, flechtenspezifischen Mikrobioms konnte erst 2009 endgültig bewiesen werden [3]. Dieses Mikrobiom formt spezifische Strukturen: Während es bei vielen Arten die Oberflächen als Biofilm besiedelt, kleidet es im Inneren von Rentierflechten Hohlräume aus. Neben diesen externen, Biofilm-ähnlichen Strukturen konnten wir Vertreter der Rhizobiales auch in den Hyphen des Pilzpartners nachweisen [4]. Generell zeichnen sich die einzelnen Flechtenarten durch spezifische Bakteriengemeinschaften aus [3], wobei bei fast allen bislang untersuchten Flechten Alphaproteobacteria die Struktur dominieren. In unserem Modellsystem Lungenflechte *Lobaria pulmonaria* L. bilden diese zusammen mit bis zu 1.000 Spezies der Sphingobacteria, Actinobacteria und Spartobacteria das Mikrobiom. Ein großer Teil dieser Mikroorganismen ist jedoch auf Gattungs- bzw. Spezieslevel unbekannt und erfordert Neubeschreibungen, wie für *Fronidhabitans cladoniiphila*

gezeigt wurde [5]. Ein Kernmikrobiom von regelmäßig auftretenden Arten konnte identifiziert werden [6]. In **Abbildung 1** sind die Partner der Lungenflechte dargestellt: Der Pilzpartner (blau) bildet die strukturelle Komponente für Algen (grün) und Bakterien (durch spezifische FISH-Sonden farbig wiedergegeben). Auch die asexuellen Verbreitungsorgane weisen ein diverses (Kern-)Mikrobiom auf (**Abb. 1C**), sie tragen allerdings auch zur lokalen Ausbreitung von Bakterien an den Flechtenstandorten bei.

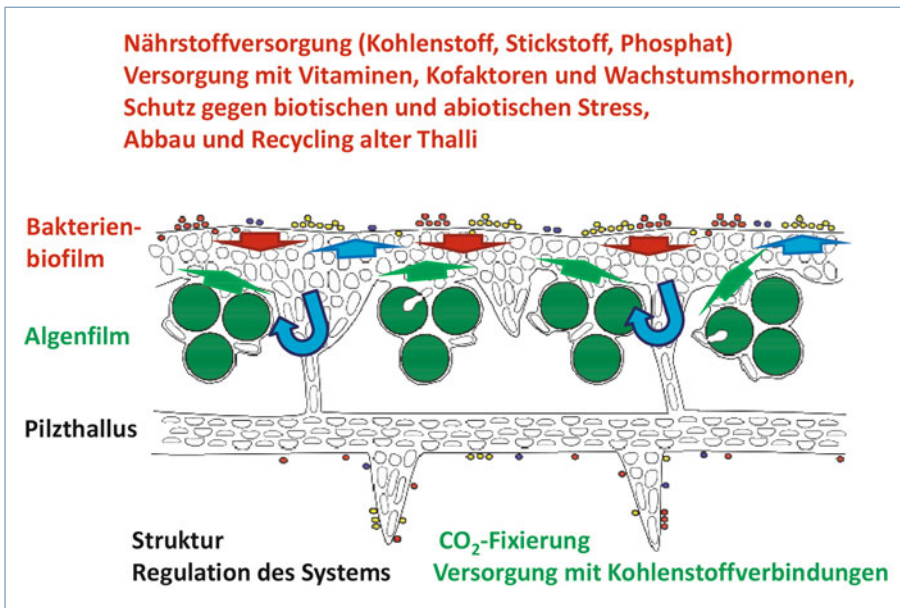
Wie in einer Miniaturversion eines Ökosystems ist das bakterielle Flechtenmikrobiom für essenzielle Funktionen im symbiotischen Zusammenhalt verantwortlich. Diese wurden mithilfe eines kombinierten Metagenom- und Metaproteomansatzes identifiziert [7]. In der Analyse der funktionellen Gene aus dem Metagenom können wir ein breites Spektrum an bakteriellen Leistungen aufgeschlüsselt für die acht häufigsten bakteriellen Gruppen sowie die am häufigsten auftretenden Alaproteobakterien

erkennen (**Abb. 2**). Den größten Anteil bilden Gene, die im Zusammenhang mit Aminosäure- und Vitaminproduktionen stehen, sowie Gene, die einen Zusammenhang mit der Stresstoleranz aufweisen. Wichtige Funktionen, die in dieser Übersicht weniger deutlich erkennbar sind, jedoch aus dem Datensatz als für die Symbiose von Bedeutung identifiziert und mit zusätzlichen Methoden verifiziert wurden, sind in **Abbildung 3** als Modell dargestellt. Das Mikrobiom ist in der Lage, das Ökosystem mit Vitaminen (z. B. B12 für Photosynthese), Wachstumshormonen, Nährstoffen (Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphat) und Mineralien zu versorgen. Zusätzlich vermittelt es einen Schutz gegenüber biotischem und abiotischem Stress. Weiterhin sind die Bakterien in der Lage, toxische Substanzen zu neutralisieren, und tragen dazu bei, Material aus älteren Thallusteilen zu mobilisieren und dem System wieder zuzuführen [7].

Flechten werden schon lange als Bioindikatoren (z. B. für Schwefeldioxid und Schwer-



◀ **Abb. 2:** Die 21 wichtigsten Funktionen wurden mittels Metagenomanalyse identifiziert und für das Mikrobiom insgesamt, für die acht abundantesten bakteriellen Gruppen sowie für das am häufigsten auftretende Phylum der Alphaproteobacteria dargestellt.



▲ **Abb. 3:** Funktionelles Modell der Flechtensymbiose. Die morphologischen Strukturen und Funktionen der einzelnen Partner sind farbig dargestellt (Mykobiont: schwarz; Photobionten: grün; Mikrobiom: rot/farbig).

metalle) herangezogen, denn einige Arten reagieren sensitiv auf Luftschadstoffe. Alle Symbiosepartner verfügen über einen reichen Sekundärstoffwechsel. Während man zunächst dachte, dass der dominante Pilzpartner für die Synthese verantwortlich ist, stellte sich nun heraus, dass auch Bakterien bioaktive Sekundärstoffe in der Flechte produzieren [8]. Einige der Sekundärstoffe der Pilzpartner sind einzigartig und finden bereits

Anwendung in der Pharmazie und Kosmetikindustrie; die von Flechtenbakterien produzierten Stoffe dürften nicht minder vielseitig sein. Erste Untersuchungen weisen auf eine Bedeutung als Zytostatika (z. B. Uncialamycin) hin; andere (Lichostatalin) sind für die Behandlung von Osteoporose interessant [9]. Der orangefarbene Flechtenfarbstoff mit dem Namen Parietin kann das Wachstum von menschlichen Leukämiezellen verlangsamen

sowie diese auch abtöten – ohne zu offensichtlichen Schäden in den Blutzellen zu führen [10]. Alle Symbiosepartner produzieren auch flüchtige Substanzen wie Pyrazine, die in der Lage sind, multiresistente Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen [11]. Eine weitere vielversprechende Anwendung liegt in den Mikrobiom-Mitgliedern selbst: Sie können als *biological control* oder *stress protection agents* eingesetzt werden [12], nachdem eine Methode zu ihrer Akquise entwickelt wurde [13].

Fazit

Die Symbiose der Flechten mit Algen, Archaeen und Bakterien, letztere mit bis zu 1.000 Arten, erlaubt ein Überleben unter Nährstoffmangel und extremen abiotischen Bedingungen. Hierzu ist eine intensive Regulation notwendig, die mit *Omics*-Technologien nachgewiesen wurde [4] und derzeit weiter studiert wird. Die Erforschung des mikrobiellen Zusammenspiels, die Funktion der Archaeen und der flüchtigen Substanzen sowie ihre biotechnologische Nutzung bieten darüber hinaus weitere Forschungsfelder der Zukunft. Auch in Mitteleuropa sind Flechten mit ca. 2.000 Arten vertreten; zu finden sind sie in sehr unterschiedlichen lichtexponierten Habitaten wie auf Felsen, an Baumstämmen und auf Ruderalstandorten. Flechten sind aufgrund ihrer Formen- und Farbenvielfalt lohnende Ziele für den nächsten Sonntagsspaziergang und die Fotoexkursion in die Natur.

Danksagung

Dieses Projekt wurde unter dem DACH von DFG und FWF gefördert (FWF-DACH Project I882). Wir danken Ines Aline Aschenbrenner und Tomislav Cernava (Graz) für ihre ausgezeichnete Mitarbeit. ■

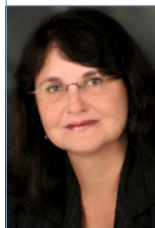
Literatur

- [1] Berg G, Grube M, Schloter M et al. (2014) The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Front Microbiol* 5:491
- [2] Grube M, Cardinale M, Vieira de Castro J et al. (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbiosis. *ISME J* 3:1105–1115
- [3] Aschenbrenner IA, Cardinale M, Berg G et al. (2014) Microbial cargo: do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens? *Environ Microbiol* 16:3743–3752
- [4] Erlacher A, Cernava T, Cardinale M et al. (2015) Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Front Microbiol* 6:53
- [5] Cardinale M, Grube M, Berg G (2011) *Fronthabitans cladoniiphilus* sp. nov., an actinobacterium of the family Microbacteriaceae isolated from lichen, and emended description of the genus *Fronthabitans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:3033–3038
- [6] Grube M, Cernava T, Soh J et al. (2015) Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *ISME J* 9:412–424
- [7] Grube M, Köberl M, Lackner S et al. (2012) Host-parasite interaction and microbiome response: effects of fungal infections on the bacterial community of the Alpine lichen *Solorina crocea*. *FEMS Microbiol Ecol* 82:472–481
- [8] Schneider T, Schmid E, de Castro JV Jr et al. (2011) Structure and function of the symbiosis partners of the lung lichen (*Lobaria pulmonaria* L. Hoffm.) analyzed by metaproteomics. *Proteomics* 11:2752–2756
- [9] Grube M, Cardinale M, Berg G (2012) Bacteria and the lichen symbiosis. In: Hock B (Hrsg) *The Mycota IX*. Springer, Berlin, S 363–372
- [10] Ruiting L, Shannon E, Changliang S et al. (2015) 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling. *Nat Cell Biol*, doi: 10.1038/ncb3255
- [11] Cernava T, Aschenbrenner IA, Grube M et al. (2015) A novel assay for the detection of bioactive volatiles evaluated by screening of lichen-associated bacteria. *Front Microbiol* 6:398
- [12] Cernava T, Müller H, Aschenbrenner IA et al. (2015) Analyzing the antagonistic potential of the lichen microbiome against pathogens by bridging metagenomic with culture studies. *Front Microbiol* 6:620
- [13] Zachow C, Müller H, Tilcher R et al. (2013) Catch the best – novel screening strategy to select stress protecting agents for crop plants. *Agronomy* 3:794–815

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Gabriele Berg
Institut für Umweltbiotechnologie
Technische Universität Graz
Petersgasse 12
A-8010 Graz
Tel.: +43-(0)316-873-8310
Fax: +43-(0)316-873-8819
gabriele.berg@tugraz.at
www.ubt.tugraz.at

AUTOREN



Gabriele Berg

Jahrgang 1963. Biologiestudium an der Universität Rostock und Forschungsstudium an der Universität Greifswald. 1995 Promotion. 1995–2004 Universitätsassistentin am Institut für Mikrobiologie der Universität Rostock. 2004–2005 Heisenberg-Stipendiatin der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Seit 2005 Professorin und Leiterin des Instituts für Umweltbiotechnologie der TU Graz, Österreich.



Katharina Riedel

Jahrgang 1968. Biologiestudium an der TU München. 1998 Promotion. 1999–2000 Postdoc am Dänemarks Technische Universität, Lyngby. 2001–2006 Arbeitsgruppenleiterin am Institut für Mikrobiologie der TU München und Universität Zürich, Schweiz. 2010–2011 Professur an der TU Braunschweig. Seit 2011 Professorin und Direktorin des Instituts für Mikrobiologie der Universität Greifswald.



Martin Grube

Jahrgang 1965. Biologiestudium an der Universität Graz, Österreich. 1995 Promotion. 1994–2001 Universitätsassistent und seit 2001 Professor am Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Graz, Österreich.