

**Bakterielle Aufnahme, Selektivität und  
interne Prozessierung bei  
marinen Schwämmen (*Porifera*)**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

Würzburg

vorgelegt von

Markus Wehrl

aus

Fulda

Würzburg, August 2006



Eingereicht am : 18. August 2006

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

1. Gutachter: PD Dr. Ute Hentschel

2. Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross



# Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

**Bakterielle Aufnahme, Selektivität und  
interne Prozessierung bei  
marinen Schwämmen (*Porifera*)**

selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich erkläre weiterhin, dass ich, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben habe, noch versucht habe zu erwerben.

Würzburg, im August 2006

(Markus Wehr)



## Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an folgende Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

**PD Dr. U. Hentschel** für die gute und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit zahlreiche Dienstreisen durchzuführen.

**Prof. Dr. R. Gross** für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit, zahlreiche anregende Diskussionen und fortwährendes Interesse an meiner Arbeit.

**PD Dr. M. Steinert** für die ständige Präsenz, zahlreiche Anregungen, themenübergreifende Diskussionen und permanenten Optimismus.

**Prof. Dr. G. Krohne** für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie, das allzeitige Interesse an dieser Arbeit und stimulierende Gespräche bis in die späten Abendstunden.

**Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker** für das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit und der Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu können.

Dem gesamten Team der Elektronenmikroskopie, besonders **C. Gehring, D. Bunsen, E. Meyer-Natus** für den schärfsten Schnitt am kritischsten Schwammgewebe.

**Prof. Dr. J. Reidl, Dr. S. Schild, Dr. K. Heuner** und **Dr. D.S. Millikan** für molekular-genetische Kniffe und Zurverfügungstellung von Bakterienstämmen.

**Prof. Dr. E. Strohm** und **Dr. A. Spahn** für die Unterstützung und Hilfe bei der statistischen Auswertung experimenteller Daten.

**Dr. P. Drechsler** für das perfekte Kurvenfitting bei der Datenauswertung und anregende Diskussionen zur Strömungsphysik der Schwämme.

**Prof. Dr. J. Pawlik** und **Prof. Dr. W. Fenical** für die Möglichkeiten an zwei Bahamas-Expeditionen teilnehmen zu können, Dank an **P. Jensen, C. Kaufman** und **T. Mincer** für die Unterstützung der experimentellen Arbeit an Bord.

**Prof. Dr. M. Ilan** und **Prof. Dr. S. Zea** für die professionelle Hilfe bei der Bestimmung mariner Schwammspezies.

**Prof. Dr. N. Lindquist, Dr. J. Weisz** und die gesamte Gruppe für die Möglichkeit des Forschungsaufenthalts in Key Largo.

Dem **SFB567** und dem technischen Betrieb des **Julius-von-Sachs-Instituts** für perfekte Organisation und die Materialunterstützung bei Dienstreisen.

**Prof. Dr. P. LeBaron** und dem gesamten Team des **Laboratoire Arago**, Banyuls-sur-Mer, für das zur Verfügung gestellte Labor und die Unterstützung während der Forschungsaufenthalte.

Den Mitarbeitern des **Instituts Ruđer Bošković**, Rovinj, für die Möglichkeit die Labore nutzen zu dürfen und die Ermöglichung von Tauchausfahrten.

Allen „**Spongeologists**“ für die lockere und angenehme Arbeitsatmosphäre, den „**Legionellas**“ für die fast dreijährige Aufnahme in ihrem Labor und das stimulierende Arbeitsklima, allen **Mitarbeitern des IMIB / ZINF** für die freundschaftliche und harmonische Zusammenarbeit.





Für meine Eltern  
und Selma



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung, Summary.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Symbiose.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Marine Schwämme (Phylum <i>Porifera</i>).....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Habitus.....	23
2.2.2 Wasserkanalsystem.....	24
2.2.3 Mesohyl.....	27
<b>2.3 Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme.....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Verteilung und Abundanz .....	29
2.3.2 Phylogenetische Diversität.....	30
2.3.3 Mögliche Symbiosefunktionen.....	32
<b>2.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>35</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Organismen.....	37
3.1.1.1 Schwämme.....	37
3.1.1.2 Marine bakterielle Isolate.....	38
3.1.1.3 <i>Escherichia coli</i> -Laborstämme.....	38
3.1.2 Plasmide.....	39
3.1.3 Oligonukleotid-Primer.....	39
3.1.4 DNA-Größen- und Mengenstandards.....	39
3.1.5 Chemikalien.....	40
3.1.6 Fluorochrome.....	40
3.1.7 Antibiotika und Substratanaloga.....	41
3.1.8 Medien für die Anzucht von Bakterien.....	41
3.1.9 Allgemeine Lösungen.....	42
3.1.10 Material und Lösungen für die Mikroskopie.....	45
3.1.11 Geräte.....	47
3.1.12 Verwendete Computersoftware und Datenbanken.....	50

<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Kultivierung und Präparation von Mikroorganismen.....	51
3.2.1.1 Anzucht von Bakterienisolaten.....	51
3.2.1.2 Präparation von Schwammsymbionten.....	51
3.2.2 Bestimmung der Bakterienzahl.....	52
3.2.2.1 Bestimmung bei kultivierbaren Bakterien.....	52
3.2.2.2 Kultivierungsunabhängige Bestimmung .....	52
3.2.3 <i>In vivo</i> Filtrationsexperimente an Schwämmen.....	53
3.2.3.1 Bestimmung der Filtrationsraten.....	54
3.2.3.2 Normalisierung der Filtrationsraten.....	55
3.2.4 Isolation von DNA.....	56
3.2.4.1 DNA-Extraktion aus bakteriellen Konsortien.....	56
3.2.4.2 Plasmid-Mini-Präparation.....	57
3.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	57
3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	58
3.2.6 DNA-Sequenzierung.....	59
3.2.7 Endonuklease-Verdau von DNA.....	60
3.2.8 Ligation von DNA.....	60
3.2.9 Elektrophoretische Methoden.....	60
3.2.9.1 Agarose-Gele.....	60
3.2.9.2 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE).....	61
3.2.10 DNA-Nachweis und Prozessierung von DGGE-Banden.....	61
3.2.11 Genetische Veränderung von Bakterien.....	62
3.2.11.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	62
3.2.11.2 Transformation von Bakterien durch Hitze-Schock.....	62
3.2.11.3 Konjugation mariner Isolate.....	63
3.2.12 Proteasebehandlung von Bakterienzellen.....	64
3.2.13 Fluoreszenzanfärbung von Bakterien.....	64
3.2.14 Visualisierung aufgenommener Partikel in Schwammgewebe.....	64
3.2.15 Anfertigung von Kryoschnitten.....	65
3.2.16 Confokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).....	65
3.2.17 Transmissionselektronenmikroskopie.....	66

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Beschreibung der Bakterienhaltigkeit .....</b>	<b>69</b>
4.1.1	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	69
4.1.1.1	Bakterienhaltige Schwämme.....	69
4.1.1.2	Bakterienarme Schwämme.....	76
4.1.2	Bestimmung der mikrobiellen Zelldichte.....	80
<b>4.2</b>	<b>Quantifizierung der bakteriellen Aufnahme .....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Bakterienhaltige Schwämme.....	81
4.2.1.1	<i>Aplysina aerophoba</i> .....	81
4.2.1.1.1	Schätzung der Pumpleistung.....	81
4.2.1.1.2	Filtration kultivierbarer Isolate.....	83
4.2.1.1.3	Inhibition der bakteriellen Aufnahme.....	86
4.2.1.1.4	Filtration des bakteriellen Seewasserkonsortiums.....	89
4.2.1.1.5	Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums.....	90
4.2.1.2	<i>Chondrosia reniformis</i> .....	91
4.2.1.2.1	Filtration von <i>Vibrio</i> sp. SB177.....	91
4.2.1.2.2	Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums.....	92
4.2.2	Bakterienarme Schwämme.....	93
4.2.2.1	<i>Dysidea avara</i> .....	93
4.2.2.1.1	Filtration von <i>Vibrio</i> sp. SB177.....	93
4.2.2.1.2	Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums.....	94
4.2.2.2	<i>Tethya aurantium</i> .....	95
4.2.2.2.1	Filtration kultivierbarer Isolate.....	95
4.2.2.2.2	Filtration von bakteriellen Konsortien.....	96
4.2.3	Statistische Beurteilung der Filtrationsraten.....	97
<b>4.3</b>	<b>Allometrie mariner Schwämme.....</b>	<b>101</b>
4.3.1	Allometrie bei <i>Aplysina aerophoba</i> .....	101
4.3.2	Allometrie bei <i>Dysidea avara</i> .....	106
<b>4.4</b>	<b>Selektivität der bakteriellen Filtration .....</b>	<b>109</b>
4.4.1	Phylogenetische Veränderung von Seewasserkonsortien.....	109
4.4.2	Phylogenetische Veränderung von Symbiontenkonsortien.....	113
4.4.3	Veränderung von Konsortienzusammensetzungen durch bakterienarme Schwämme.....	117

<b>4.5</b>	<b>Interne Prozessierung aufgenommener Partikel und Bakterien .....</b>	<b>119</b>
4.5.1	Aufnahme von Latex Beads.....	119
4.5.1.1	Verteilung in der Mesohylmatrix.....	119
4.5.1.2	Feinlokalisierung in der Mesohylmatrix.....	121
4.5.2	Aufnahme von <i>Vibrio</i> sp. MMW1.....	123
4.5.3	Aufnahme von Rhodamin-markierten Schwammsymbionten.....	124
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>127</b>
<b>5.1</b>	<b>Die mikrobielle Assoziation mariner <i>Demospongiae</i>.....</b>	<b>127</b>
5.1.1	Elektronenmikroskopische Beurteilung der Bakterienhaltigkeit.....	127
5.1.2	Korrelation zwischen Bakterienhaltigkeit und mikrobieller Diversität.....	130
5.1.3	Korrelation zwischen Bakterienhaltigkeit und Schwamntaxonomie.....	131
5.1.4	Anatomische Aspekte der Bakterienhaltigkeit.....	132
<b>5.2</b>	<b>Bakterielle Aufnahme mariner Schwämme.....</b>	<b>134</b>
5.2.1	Auswahl des experimentellen Designs.....	134
5.2.2	Bakterienhaltige Schwämme.....	135
5.2.2.1	Aufnahme mariner Bakterienisolate.....	135
5.2.2.2	Aufnahme des Seewasserkonsortiums.....	137
5.2.2.3	Aufnahme des Symbiontenkonsortiums.....	137
5.2.3	Bakterienarme Schwämme.....	141
<b>5.3</b>	<b>Pumpleistung und Allometrie der bakteriellen Filtration .....</b>	<b>142</b>
5.3.1	Pumpleistung.....	142
5.3.2	Allometrie.....	143
<b>5.4</b>	<b>Analyse der Aufnahme von mikrobiellen Konsortien mittels DGGE.....</b>	<b>145</b>
5.4.1	DGGE-Analyse des bakteriellen Seewasserkonsortiums.....	145
5.4.2	DGGE-Analyse des Symbiontenkonsortiums.....	146
<b>5.5</b>	<b>Prozessierung von Partikeln und Bakterien in der Mesohylmatrix.....</b>	<b>148</b>
5.5.1	Aufnahme und Prozessierung von Latex Beads.....	148
5.5.2	Aufnahme und Prozessierung von „Futterbakterien“ und Symbionten.....	149
<b>5.6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>151</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>169</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	169

---

7.2	Anhang A1-Filtrationsexperimente an <i>A. aerophoba</i> .....	173
7.3	Anhang A2-Filtrationsexperimente an <i>C. reniformis</i> .....	176
7.4	Anhang A3-Filtrationsexperimente an <i>D. avara</i> .....	177
7.5	Anhang A4-Filtrationsexperimente an <i>T. aurantium</i> .....	178
7.6	Anhang A5-Inhibition der bakteriellen Aufnahme.....	179
7.7	Anhang A6-Filtrationsraten bei DGGE-Untersuchung .....	181
7.8	Anhang B1-RFLP-Muster verwendeter Laborstämme.....	182
<b>8</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>183</b>
<b>9</b>	<b>Forschungsaufenthalte.....</b>	<b>184</b>
<b>10</b>	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>185</b>





## Zusammenfassung

Marine Schwämme (*Porifera*) gelten als die evolutionär ältesten Metazoen. Sie sind in allen Meeren verbreitet und tragen einen großen Anteil zur Invertebraten-Fauna bei. Ihrer Lebensweise als Filtrierer entsprechend pumpen Schwämme bis zu 23.000 l Seewasser  $\text{Kg}^{-1}$  Schwamm  $\text{Tag}^{-1}$ . Das enthaltene Bakterioplankton wird mit hoher Effizienz ausgefiltert und dient als Nahrung. Gleichzeitig enthalten einige Schwammspezies eine sehr hohe Anzahl phylogenetisch diverser Bakterien extrazellulär in der Mesohylmatrix, die bis zu 40% der Gesamtbiomasse ausmachen. Die als Symbionten bezeichnete Bakteriengemeinschaft weist eine hochgradig spezifische phylogenetische Zusammensetzung auf, die bei unterschiedlichen Schwammspezies, jedoch nicht im Seewasser oder Sediment, gefunden wird.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden unterschiedliche Muster der Bakterienhaltigkeit mariner Schwämme durch Elektronenmikroskopie beschrieben. Die Gruppe der bakterienhaltigen Schwämme wies eine hohe Anzahl von Mikroben im Mesohyl auf. Aufgrund der bakteriellen Verteilung wurde zwischen stark und intermediär bakterienhaltigen Spezies unterschieden. Stark bakterienhaltige Schwämme zeigten eine gleichmäßig dichte Verteilung der Mikroben im Mesohyl, die Bakterienkonzentrationen lagen bei  $10^9 - 10^{10}$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Schwamm. Intermediär bakterienhaltige Schwämme enthielten lokale Anhäufungen von Mikroben, die in allen Stellen des Tieres gefunden wurden. Die Zellzahlen lagen bei  $10^8 - 10^9$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Schwamm. Die Gruppe der bakterienarmen Schwämme wurde durch ein mikroskopisch bakterienfreies Mesohyl charakterisiert, die Bakterienkonzentrationen betragen  $\sim 10^6$  Zellen  $\text{g}^{-1}$  Schwamm und waren damit vergleichbar zu natürlichem Seewasser. In Korrelation zum Bakteriengehalt wurden anatomische Unterschiede des Gewebes beider Schwammgruppen beobachtet.

Die bakterielle Aufnahme von Schwämmen wurde an einzelnen Individuen in Filtrationsexperimenten untersucht. Es wurde die Aufnahme des „Futterbakteriums“ *Vibrio* sp. SB177 und des schwammspezifischen Symbiontenkonsortiums gemessen. Die bakterienhaltigen Schwämme *Aplysina aerophoba* und *Chondrosia reniformis* wiesen im Vergleich zu „Futterbakterien“ eine sehr stark verminderte Aufnahme gegenüber ihren eigenen Symbionten auf, bei *A. aerophoba* sank die Filtrationsrate von  $r_n = 2,76 \times 10^6$  auf  $5,47 \times 10^4$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Schwamm  $\text{h}^{-1}$ . Die bakterienarmen Schwämme *Dysidea avara* und *Tethya aurantium* zeigten eine effiziente und undifferenzierte Aufnahme gegenüber allen Mikroben. Das nur bei bakterienhaltigen Schwämmen gefundene Muster der stark verminderten Aufnahme von Symbionten ist statistisch signifikant. Untersuchungen zum Einfluss abdaubarer bakterieller Zell-

wandproteine und der bakteriellen Flagelle erbrachten keine Hinweise auf eine Beteiligung dieser Faktoren am bakteriellen Filtrationsprozess der Schwämme.

Zur Untersuchung einer möglichen Filtrationsselektivität gegenüber bestimmten bakteriellen Vertretern des Seewasser- und des Symbiontenkonsortiums wurden Filtrationsexperimente durchgeführt. Proben des Inkubationswassers wurde während des Experiments entnommen und die phylogenetische Zusammensetzung der Konsortien mittels Denaturierender Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) untersucht. Die Banden wurden anhand der Stärke über den zeitlichen Verlauf klassifiziert. Von den anfänglich 40 nachweisbaren Banden des Seewasserkonsortiums wurden nach 300 Minuten experimenteller Dauer eine als konstant, 18 als reduziert und 21 als verschwindend eingeordnet. Für das Symbiontenkonsortium wurden von den initial 65 Banden nach 300 Minuten 30 Banden als konstant, 19 als reduziert und 16 als verschwindend klassifiziert. Während für das Seewasserkonsortium eine Aufnahme fast aller bakterieller Phylotypen überwog, unterlagen nur wenige Phylotypen des Symbiontenkonsortiums einer starken Aufnahme. Durch Sequenzierung und phylogenetische Zuordnung repräsentativer Banden wurde gezeigt, dass für die bakterielle Aufnahme keine Selektivität gegenüber einer bestimmten phylogenetischen Abstammungslinie besteht. So wurden z. B. Phylotypen der *Chloroflexi* als konstant, reduziert, als auch verschwindend beurteilt.

Die interne Prozessierung und der Transport aufgenommener Partikel und Bakterien im Mesohyl wurde mikroskopisch untersucht. *A. aerophoba* transportierte große Aggregate aufgenommener Latex Beads in speziellen Schwammzellgruppen durch das Mesohyl. Es konnte keine Abgabe der Beads in die extrazelluläre Matrix (ECM) beobachtet werden. *D. avara* transportierte einzelne Beads durch das Mesohyl, nach 300 Minuten wurden zahlreiche Beads in der ECM gefunden. Die bakterielle Aufnahme wurde an dem GFP-exprimierenden „Futterbakterium“ *Vibrio* sp. MMW1 visualisiert. Die Bakterien wurden mit hoher Effizienz von *A. aerophoba* aufgenommen, konnten jedoch nicht in tieferen Mesohylbereichen nachgewiesen werden, was auf eine zügige Lyse der Zellen hindeutete. Fluoreszenzmarkierte Symbiontenzellen wurden nicht von *A. aerophoba* aber, in Übereinstimmung mit den Filtrationsexperimenten, von dem bakterienarmen *D. avara* aufgenommen.

Die Ergebnisse belegen, dass bakterienhaltige Schwämme über einen komplexen Mechanismus der bakteriellen Aufnahme verfügen, durch den zwischen Futterbakterien und Symbionten unterschieden wird. Schwämme stellen deshalb ein interessantes Modellsystem zur Untersuchung von Mechanismen der generellen Phagozytose und der gleichzeitigen Tolerierung von symbiontischen Bakterienzellen im Gewebe dar.

# 1 Summary

Marine sponges (*Porifera*) are probably the oldest metazoans on earth. Whereas they are abundant in all seas, they contribute significantly to the marine invertebrate fauna. As filter feeders, sponges process enormous volumes of water, ranging up to 23,000 l seawater Kg<sup>-1</sup> sponge day<sup>-1</sup>. During the passage through the animal's body, the bacterioplankton is retained. Despite the fact that sponges feed on these bacteria, some species harbour large amounts of bacteria intercellularly within the mesohyl matrix that amount to up to 40 % of the sponge biomass. These bacteria, termed symbionts, make up a highly sponge specific bacterial consortia that is shared by different sponge species, but not found in surrounding seawater or sediments.

In this PhD thesis, electron microscopy was conducted to analyse patterns of bacterial content of different sponge species. The group of the bacteriosponges contained high numbers of symbionts. Due to the bacterial distribution in the mesohyl species were differentiated into “high-microbial-abundance sponges” and “intermediate-microbial-abundance sponges”. The former harboured a high number of uniformly distributed cells with bacterial concentrations in the range of 10<sup>9</sup> - 10<sup>10</sup> cells g<sup>-1</sup> sponge. “Intermediate-microbial-abundance sponges” showed clusters of symbiont cells that were evenly distributed in the mesohyl, the symbiont concentration amounted to 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> cells g<sup>-1</sup> sponge. The group of the “low-microbial-abundance sponges” were characterized by a mesohyl essentially free of bacterial cells. The quantification of microorganisms gave concentrations of about ~10<sup>6</sup> cells g<sup>-1</sup> sponge, equivalent to the concentration of natural seawater. Observed differences of tissue anatomy correlated with the microbial content of various species.

The bacterial retention of sponge individuals was tested for the food bacterium *Vibrio* sp. SB177 and sponge symbiont consortia. The bacteriosponges *Aplysina aerophoba* and *Chondrosia reniformis* showed a strongly reduced uptake for the sponge symbiont consortia compared to food bacteria, for *A. aerophoba* the retention rates dropped from  $r_n = 2,76 \times 10^6$  to  $5,47 \times 10^4$  bacteria g<sup>-1</sup> sponge h<sup>-1</sup>. The “low-microbial-abundance sponges” *Dysidea avara* and *Tethya aurantium* exhibited an efficient and unselective uptake of all tested bacteria. The pattern of strongly reduced uptake of symbionts by their own hosts is statistically significant. Investigations concerning the influence of bacterial cell wall structures like the flagella or enzymatically degradable cell wall proteins showed no effect.

To investigate the filtration selectivity against certain bacterial lineages of the seawater and symbiont consortia, filtration experiments were undertaken. Denaturing gradient

gel electrophoresis (DGGE) was used to monitor the composition of bacterial consortia in the incubation water during the experiments. Bands were classified according to their intensity over time. For the seawater consortia, initially 40 bands were detected and after 300 minutes, one band was classified as constant, 18 as reduced and 21 as disappearing. The symbiont consortia was initially made up of 65 bands and after 300 minutes 30 bands were assessed as constant, 19 as reduced and 16 as disappearing. Whereas for the seawater consortia the majority of phylotypes was taken up, only a small number of symbiont phylotypes disappeared. By sequencing and taxonomic affiliation of representative bands, it was concluded that filtration selectivity against certain phylogenetic lineages was not apparent. For example, phylotypes affiliated to the *Chloroflexi*, were judged as constant, as well as intermediate and reduced.

Internal processing and transport of ingested particles was microscopically investigated using latex beads. *A. aerophoba* transported large aggregates of beads through the mesohyl, with the beads carried by special groups of sponge cells. A disposal of beads into the extracellular matrix was not observed. In contrast, *D. avara* conveyed single beads through the mesohyl and after 300 minutes a release into the extracellular matrix was evident. The uptake of bacteria was investigated using the GFP-expressing food bacterium *Vibrio* sp. MMW1. In *A. aerophoba* fluorescent cells were observed in the tissue adjacent to the water system but failed to be detected in deeper mesohyl regions, indicating a fast digestion of bacterial cells. Fluorescently labeled symbionts were not taken up by *A. aerophoba* but were detected numerously in the mesohyl of the “low-microbial-abundance sponge” *D. avara*, consistent with the filtration experiments.

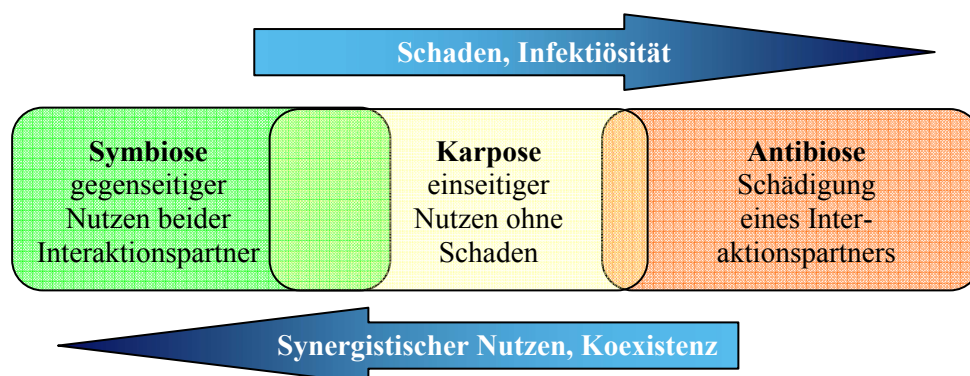
The overall results of this PhD thesis point out that bacteriosponges possess a complex mechanism of bacterial uptake that accounts for the differentiation between food bacteria and the symbiont consortia. Hence, bacteriosponges are an interesting model system to investigate the mechanisms of general phagocytosis and simultaneous toleration of intercellular symbiotic bacteria.

## 2 Einleitung

### 2.1 Symbiose

„...des Zusammenlebens ungleichnamiger Organismen...“, so führte de Bary den Begriff der Symbiose 1879 ein (de Bary 1879). Seit damals hat der Begriff starke konzeptionelle Präzisierung erfahren. Gegenwärtig unterscheidet man die Interaktionsmodelle Antibiose, Karpose und Symbiose (Matthes 1978, Smith & Douglas 1987, Douglas 1994). Während die Einteilung in die unterschiedlichen Formen zunächst klar erscheint, findet sich in der Natur ein Kontinuum zwischen allen Formen (Abb. 2.1.1). Die Antibiose fasst Episitismus und Parasitismus zusammen. Bei diesen zwischenartlichen Interaktionen hat eine Art Vorteile auf Kosten und Schaden der anderen Art. Im Fall des Episitismus handelt es sich um die klassischen Räuber-Beute-Beziehungen, Beispiele für Parasitismus liefern die zahlreichen Infektionserreger, die mittels spezieller Pathogenitätsmechanismen (Hacker & Kaper 2002, Hacker & Heesemann 2004) ihren Wirt schädigen, aber meist überleben lassen. Die Karpose beschreibt Beziehungen, bei der eine Art Vorteile durch die Interaktion hat, ohne die andere Art zu schädigen. Je nach Art der Interaktion gibt es zahlreiche unterschiedliche Karposeformen, Beispiele sind der Wuchs von Flechten auf Bäumen (Symphorismus) oder die Besiedlung von leeren Schneckengehäusen durch Einsiedlerkrebse (Entökie).

Im Interaktionsmodell der Symbiose haben beide Partner Vorteile von der Interaktion. Zur Beurteilung einer Symbiose wird auch die Dauer der Interaktion herangezogen. Heute wird allgemein angenommen, dass sich bei der typischen Eusymbiose „die Interaktionsdauer über einen bedeutenden Zeitraum verglichen mit der Gesamtlebenserwartung des Wirts“ erstreckt (Smith & Douglas 1987).



**Abb. 2.1.1:** Gegenüberstellung verschiedener Interaktionsformen zwischen Organismen, modifiziert aus: Steinert et al. 2000.

Kurzfristige Interaktionen, wie die Pollination, werden dabei meist als Mutualismus oder Karpose eingeordnet. Bei der Symbiose kann die zwischenartliche Interaktion von unterschiedlicher Intensität sein. Bei der Eusymbiose ist die Interaktion so stark, dass die beiden Spezies unter natürlichen Bedingungen allein nicht mehr überlebensfähig sind. Um sicherzustellen, dass die nachfolgende Wirtsgeneration mit den Symbionten assoziiert ist, werden diese oftmals über die Embryonalstadien vertikal weitergegeben (Schröder et al. 1996). Bei diesen obligaten Symbiosen erfolgt die Interaktion zwischen beiden Partnern oftmals auf der Ebene des Primärmetabolismus. Als extremstes Beispiel kann dafür die durch die Endosymbiontentheorie beschriebene Genese der Eukaryotenzelle angeführt werden (Margulis 1970, 1981). Weitere gut untersuchte Beispiele sind Flechten (DePriest 2004) und Blattschneiderameisen (Hölldobler & Wilson 1990, Chapela et al. 1994, Poulsen et al. 2005). Beim Mutualismus haben beide Arten Vorteile von der Interaktion, jedoch sind beide Partner noch selbständig überlebensfähig. Ein Beispiel hierfür ist die Symbiose zwischen dem Tintenfisch *Euprymna scolopes* und biolumineszenten *Vibrio fischeri*, die die Leuchtorgane der Tintenfische besiedeln (Ruby 1996, Ruby & Lee 1998). Während zahlreiche spezifische Symbiosen lediglich zwischen zwei Arten bestehen, z. B. Ameisen der Gattung *Camponotus* mit *Blochmannia* sp. (Schröder et al. 1996, Bouseaux-Eude & Gross 2000, Zientz et al. 2005), sind auch Symbiosen mit Konsortien von Symbionten bekannt. Zum Beispiel bilden Darmbakterien ein komplex zusammengesetztes Symbiontenkonsortium, dessen bakterielle Diversität erst in den letzten Jahren annähernd aufgeklärt werden konnte (Krause & Russel 1996, Ohkuma & Kudo 1996, Peterka et al. 2003, Macfarlane & Macfarlane 2004, Bäckhed et al. 2005).

Symbiosen sind weit verbreitete und ökologisch bedeutsame Interaktionsformen (Douglas 1989, Douglas 1994), die evolutionär als sehr alt datiert werden. Die Assoziation von Insekten mit Bakterien wird auf mindestens etwa 200 – 300 Mio. Jahre geschätzt (Moran & Telang 1998). Ein Vergleich von bakteriellen Symbionten und Pathogenen ergibt, dass oftmals sehr ähnliche Mechanismen für die Ausbildung beider Interaktionsformen verwendet werden (Hentschel et al. 2000, Goebel & Gross 2001). So ist zum Beispiel der Export von Effektormolekülen ein genereller Mechanismus in beiden Systemen. Die bei pathogenen Mikroorganismen häufig gefundenen Typ-III / IV-Sekretionssysteme wurden aber auch bei Symbionten nachgewiesen (Viprey et al. 1998, Sullivan et al. 2002). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wird davon ausgegangen, dass insbesondere die Symbiose mit Bakterien eine evolutionär alte, sehr fein ausregulierte Interaktionsform darstellt, bei der durch Nutzung

synergistischer Effekte neue ökologische Nischen besetzt werden konnten und die Artbildung vorangetrieben wurde (Steinert et al. 2000).

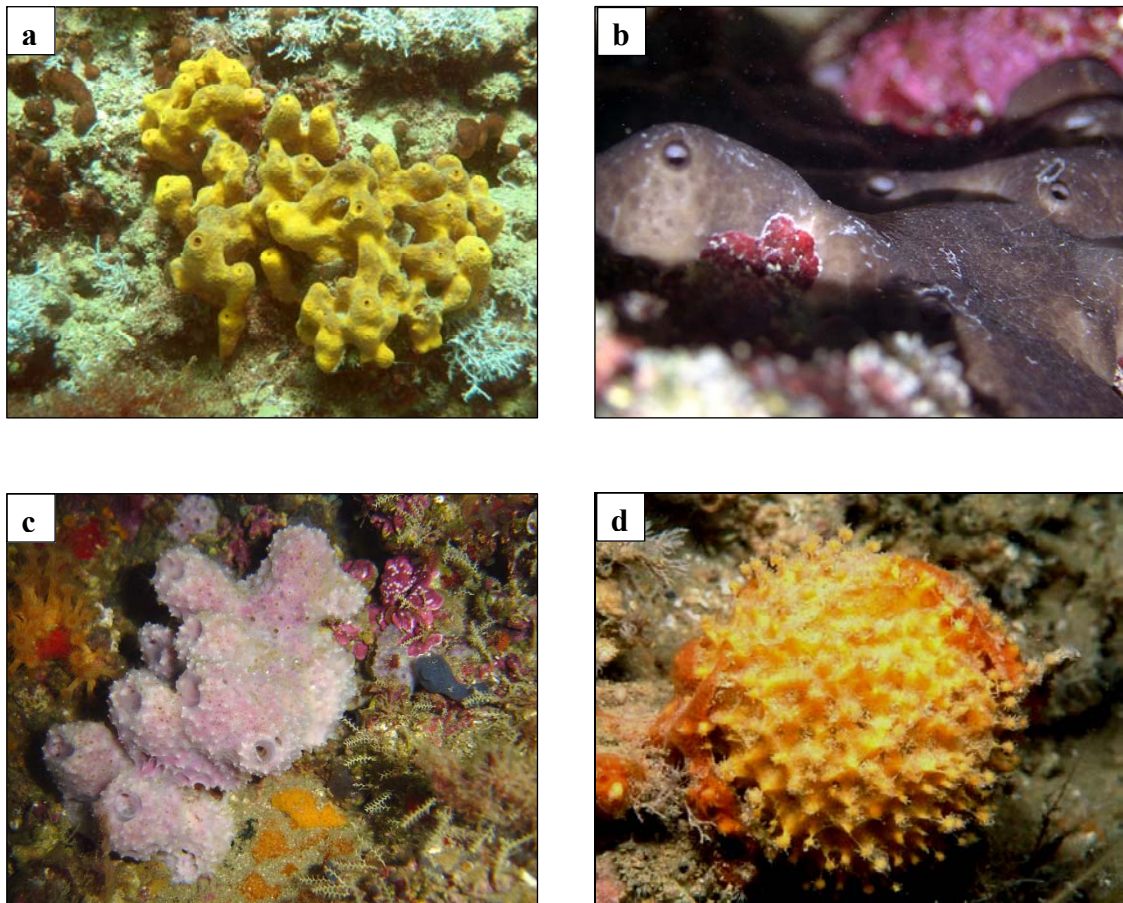
## 2.2 Marine Schwämme (Phylum *Porifera*)

Bei Schwämmen handelt es sich um das evolutionär am ältesten eingeschätzte Phylum der *Metazoa*. Fossilienfunde wurden für das frühe Kambrium vor etwa 580 Mio. Jahren nachgewiesen (Li et al. 1998), der evolutionäre Ursprung wird vor etwa 1 Mrd. Jahren vermutet. Die überwiegende Mehrzahl der über 6000 taxonomisch beschriebenen Arten lebt marin, eine evolutionär jüngere, kleine Anzahl von etwa 120 Arten lebt im Süßwasser (Hooper & Van Soest 2002). Schwämme sind in allen marinen Habitaten abundant, von arktischen Gewässern (Kunzmann 1996) bis in die Tropen, wo die höchste Diversität und Biomasse angetroffen wird (Wilkinson 1987 II, Diaz & Rützler 2001). Marine Schwämme wachsen langsam, für Spezies in tropischen Riffen wurden Wachstumsraten von <33 % Massenzunahme Jahr<sup>-1</sup> ermittelt (Wilkinson 1978 I), arktische Spezies wachsen noch weitaus langsamer. Dabei können sowohl tropische als auch arktische Vertreter Größen bis etwa 2 m erreichen und die Biomasse kann bis 500 Kg betragen. Das Alter arktischer Exemplare wird auf mehr als 10.000 Jahre geschätzt (Gatti & Brey 2002, [www.awi-bremerhaven.de](http://www.awi-bremerhaven.de)).

### 2.2.1 Habitus

Der Habitus rezenter Spezies ist äußerst vielfältig. Von aufrecht zylindrisch, kegelförmig, kugelförmig, unregelmäßig kompakt, dünn langgestreckt bis mehr oder weniger flach auf dem Substrat aufliegend werden alle denkbaren Zwischenformen gefunden (Abb. 2.2.1), auch in das Substrat inkrustierende Spezies sind beschrieben. Schwämme verwirklichen ein offenes Bauprinzip des Körpers, das heißt, dass Vertreter wie *A. aerophoba* und *D. avara* im Laufe des Wachstums die Anzahl der Schlote erhöhen, *C. reniformis* überwächst eine größere Fläche. Entsprechend ihrer Einordnung als *Parazoa* sind keine spezialisierten Gewebe und Organe realisiert. Der Körper gliedert sich in zwei, das Gewebe nach außen begrenzende Zellschichten, das Pinacoderm und das Choanoderm, dazwischen liegt das massiv ausgebildete Mesohyl. Zur Stabilisierung des Körpers dienen die als Spiculae (Sklerite) bezeichneten Skelettelemente, die als taxonomisches Merkmal bei der Artbestimmung

herangezogen werden (Hooper & Van Soest 2002) und einen hoch diversen und komplexen Aufbau haben (Uriz et al. 2003). Bei der Klasse der *Hexactinellida* (Glasschwämme) bestehen die Spiculae aus charakteristischen Kieselsäurefasern, bei der Klasse der *Calcarea* (Kalkschwämme) aus Calciumcarbonatnadeln. Die Gruppe der *Demospongiae* (Hornkieselschwämme) bildet Proteinfasern, sogenannte Sponginfasern, und z. T. Kieselsäurenadeln. Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies gehören alle zur Klasse der *Demospongiae*, die etwa 85 % aller Schwämme ausmachen.



**Abb. 2.2.1a - d:** Habitus mediterraner *Porifera* *in situ*. **a:** *A. aerophoba* (Thorsten Winter), **b:** *C. reniformis* (naturepicture.net), **c:** *D. avara* (subaqua.web.cern.ch), **d:** *T. aurantium* (nordpasdecalais.fr).

### 2.2.2 Wasserkanalsystem

#### Anatomie und Physiologie

Die *Porifera* ernähren sich, mit Ausnahme weniger Vertreter (Vacelet & Boury-Esnault 1995), als Suspensionsfiltrierer. Die Aufnahme von gelösten Stoffen (Stephens & Schinske 1961, Schmidt 1970, Wilkinson & Garrone 1980) und Nahrungspartikeln erfolgt im Körper



des Tieres. Über zahllose, mikroskopisch kleine Dermalporen (Ostia) tritt das planktonhaltige Seewasser in den Körper des Tieres ein. Ein stark verzweigtes Wasserkanalsystem mit komplexer Anatomie (Reiswig 1975 I) leitet das Seewasser zum Choanoderm. Je nach Verzweigungsgrad der Kanäle und der Anordnung des Choanoderms wird zwischen Ascon-, Sycon- und Leucontyp unterschieden (Abb. 2.2.2). Die untersuchten Spezies gehören dem komplex aufgebauten Leucontyp an. Die mit Pinacozyten ausgekleideten Wasserkanäle verzweigen sich stetig, dabei nimmt ihr Durchmesser ab.

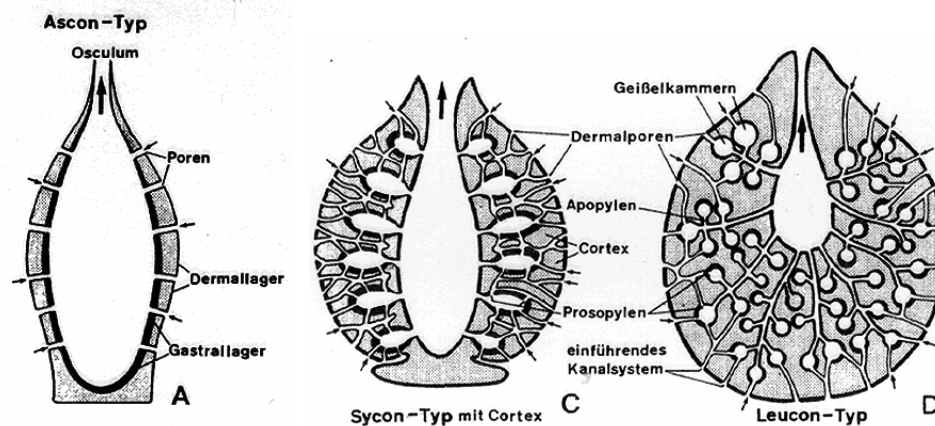


Abb. 2.2.2A, C, D: Organisationstypen der Schwämme. A: Ascon-, C: Sycon-, D: Leucon-Typ, aus Kaestner 1993.

Schließlich münden sie in das stark verjüngte Prosodium, das die Eintrittsöffnung in die Choanozytenkammern bildet. In diesen kammerförmig aufgeweiteten Hohlräumen ist das Choanoderm lokalisiert. Die einzelnen Choanozyten tragen eine zentral, Richtung Lumen inserierte Cilie. Das konzertierte Schlagen aller Cilien bewirkt einen gerichteten aktiven Wasserstrom durch das Kanalsystem. Jede Cilie wird radial von einem Mikrovillikranz umstanden, der Abstand der einzelnen Mikrovilli beträgt  $\sim 100$  nm. An dieser Reuse werden Nahrungspartikel ausgefiltert („collar-sieving“) und durch den Choanozyten phagozytiert (Reiswig 1971 II, Wilkinson et al. 1984). Die Choanozytenkammern münden wieder in Wasserkanäle, die das gefilterte Wasser drainagieren und dem Oscularrohr zuführen, von wo es ausgeschieden wird.

*In situ* Pumpraten wurden an verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen Methoden bestimmt, dabei wurden hohe Pumpraten von über  $23.000 \text{ l Tag}^{-1} \text{ l}^{-1}$  Schwamm ermittelt (Reiswig 1974). Die Pumpaktivität scheint durch eine Strömung des Umgebungswassers induziert zu werden (Vogel 1977). Verschiedene Schwammspezies weisen jedoch ganz unterschiedliche Aktivitätsmuster auf (Reiswig 1971 I). Für die Pump- und Filtrationsleistung

wurde eine Temperaturabhängigkeit beschrieben (Riisgård et al. 1993). An verschiedenen Schwammspezies wurde beobachtet, dass die Pumpleistung einen stark allometrischen Charakter aufweist. Allometrie, im Gegensatz zur Isometrie, beschreibt, dass eine Unproportionalität zwischen einer Körpergröße und z. B. einer physiologischen Leistung vorliegt. Bei Schwämmen ist die Pumpleistung nicht proportional mit der Körpermasse korreliert, sondern nimmt langsamer zu oder stagniert ab einer gewissen Körpergröße (Reiswig 1974, Frost 1980, Riisgård et al. 1993, Ribes et al. 1999, Yahel et al. 2003). Bislang gibt es noch keine stichhaltigen Erklärungsmodelle für dieses Phänomen.

### **Filtration**

Während der Passage des Seewassers durch den Schwammkörper werden Planktonpartikel in den Wasserkanälen und besonders den Choanozytenkammern ausfiltriert und als Nahrung aufgenommen. Schwämme filtrieren insbesondere die Ultraplanktonfraktion des Seewassers, diese wird als Größenfraktion  $<5 \mu\text{m}$  definiert. Sie wird quantitativ stark von heterotrophen Bakterien dominiert, ferner zählen Cyanobakterien und ein kleiner Anteil phototropher Eukaryoten dazu (Murphy & Haugen 1985, Fuhrmann et al. 1989, Ducklow 2000). Bahnbrechende Arbeiten von Reiswig (1971 II) zeigten, dass Bakterien mit sehr hoher Effizienz ( $>94\%$ ) aufgenommen werden. Nachfolgend wurde für zahlreiche weitere Spezies aus tropischen bis borealen Habitaten eine ebenfalls hohe Aufnahme von Bakterien nachgewiesen (Pile et al. 1996, Pile 1997, Bell et al. 1999, Pile 1999). Eine jeweils variierende Anatomie des Wasserkanalsystems und eine etwaige Bakterienhaltigkeit der Schwämme hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Filtrationseffizienz gegenüber Bakterien (Reiswig 1971 II, Wilkinson 1978 I). Aufgrund der hohen Abundanz im Seewasser und der effizienten Filtration stellen Bakterien die Hauptquelle für partikuläre C- und N-Verbindungen dar (Reiswig 1971 II, Reiswig 1975 II, Ribes et al. 1999, Pile et al. 2003, Lesser 2006). Jedoch wird auch diskutiert, ob Schwämme in der Lage sind, einen Hauptteil der benötigten organischen Kohlenstoffverbindungen in gelöster Form aufzunehmen (Reiswig 1971 II, Wilkinson & Garrone 1980, Pile 1997, Yahel et al. 2003). Lediglich ausgewählte Spezies scheinen über eine gewisse Plastizität bei der Aufnahme von Planktonpartikel zu verfügen und auch größere Picoeukaryoten aufzunehmen (Pile et al. 1996, Ribes et al. 1999).

Der für Schwämme einzigartige Filtrationsmechanismus des „collar sieving“ (Riisgård & Larsen 2001) ermöglicht Schwämmen die Aufnahme kleiner Partikel bis etwa 200 nm Größe, die anderen marinen Organismen nicht zugänglich sind. Sie scheinen dadurch fast

exklusiv die Nahrungsnische für das kleine Bakterioplankton zu besetzen (Stuart & Klumpp 1984, Coma et al. 2001).

### **Spezifität der Filtration**

Bislang berichtet lediglich eine Studie von einer Selektivität des Filtrationsprozesses (Wilkinson et al. 1984). In dieser Arbeit wurde die Aufnahme von bakteriellen Isolaten mikroskopisch untersucht. Die getesteten Isolate waren zunächst von *A. aerophoba* und *A. cavernicola* isoliert worden. Durch numerische Taxonomie wurde gezeigt, dass es sich um schwammassoziierte Bakterien handelte, die sich vom Konsortium der Seewasserbakterien unterschieden (Wilkinson et al. 1981). Ausgewählte Isolate wurden anschließend an die jeweilige Schwammspezies zurück gefüttert. Durch radioaktive Markierung der Bakterien und anschließender Autoradiografie des Schwammgewebes konnte gezeigt werden, dass diese schwammassoziierten Bakterien nicht oder nur ganz vereinzelt in das Schwammgewebe aufgenommen wurden. Im Gegensatz dazu wurden Seewasserbakterien in großer Zahl und sehr effizient vom Schwamm aufgenommen. Die Quantifizierung der Aufnahme dieser schwammassoziierten Bakterien an den australischen Schwämmen *Pericharax heteroraphis* und an *Spongia* sp. ergab ein ähnliches Muster. Während Seewasserbakterien sehr schnell aufgenommen wurden, erfolgte die Aufnahme der assoziierten Bakterien wesentlich langsamer und ineffizienter. Die beschriebene Studie ist die bisher einzige Arbeit, die belegt, dass Schwämme über einen selektiven Filtrationsmechanismus verfügen könnten, der die Differenzierung zwischen schwammassoziierten Bakterien und den als Futter dienenden Seewasserbakterien erlaubt.

### **2.2.3 Mesohyl**

Das Mesohyl besteht aus einer sehr massiven extrazellulärer Matrix (ECM), in die verschiedene Schwammzelltypen und bei bakterienhaltigen Schwämmen zusätzlich zahlreiche Mikroorganismen eingebettet sind. Die gelartige ECM besteht aus diversen hochmolekularen Glykoproteinen und weist die wesentlichen, von höheren Vertebraten bekannten Bestandteile auf. Verschiedene Kollagentypen, darunter Typ IV-Kollagen (Exposito et al. 2002), Fibronectin, Tenascin und Laminin (Akiyama & Johnson 1983, Humbert-David & Garonne 1993, Müller & Müller 2003), ebenso wie Lectine (Miarons & Fresno 2000, Schröder et al.

2003) konnten nachgewiesen werden. Die Bindung der Schwammzellen an die ECM erfolgt durch Integrine, deren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten kloniert werden konnten (Brower et al. 1997, Pancer et al. 1997). Die Bildung einer ECM gilt als ein grundlegendes Novum bei der Evolution der Metazoen (Wilkinson 1983 II, Schütze et al. 2001).

Die verschiedenen Schwammzelltypen haben jeweils spezialisierte Funktionen. Die bereits erwähnten Pinacozyten bilden eine epithelartige Gewebeschicht und sind phagozytotisch aktiv, ferner vermögen sie durch Kontraktion die Pumpleistung des Schwammes zu regulieren. Die ebenfalls stark phagozytierenden Choanozyten generieren den Wasserstrom durch das Kanalsystem. Lophozyten bilden Kollagenfibrillen und sezernieren diese ebenso wie die von Spongiozyten gebildeten Sponginfasern und die von Sklerozyten gebildeten Sklerite. Amöbozyten zeigen starke Phagozytose- und Transzytoseaktivität, sie sind stark motil und an der Verteilung der aufgenommenen Nahrungspartikel beteiligt („amoebocyte-cycle“) (Reiswig 1971 II). Die Archaeozyten sind undifferenziert und können alle weiteren Zelltypen bilden. Ferner liegen Speicherzellen vor, bei *A. aerophoba* sogenannte Rosettenzellen, die mit elektronendichtem Material gefüllt sind und über keinen Nucleus mehr verfügen. Da es zu den verschiedenen Schwammzelltypen funktionell entsprechende Protozoen in der Natur gibt (Choanozyten entsprechen Choanoflagellaten, Amöbozyten entsprechen freilebenden Amöben, Sklerozyten entsprechen z. B. Foraminiferen und Radiolarien) wird der evolutionäre Ursprung der Schwämme von Protozoen ausgehend vermutet (Wilkinson 1983 II).

Ein Charakteristikum aller Zelltypen ist die Redifferenzierbarkeit und Totipotenz. So wird dem am komplexesten differenzierten Zelltyp der Choanozyten die Beteiligung bei der Bildung von Gameten zugesprochen (Kaestner 1993). Es findet keine konsequente Trennung von somatischen Zellen und Keimbahnzellen statt. Eine Grundlage für die Redifferenzierbarkeit und Totipotenz ist das Überwinden der zellulären Alterung. Bei *Suberites domuncula* wurde eine hohe Telomerase-Aktivität beschrieben, die die fortlaufende Verkürzung der Chromosomen regeneriert (Custodio et al. 1998).

Trotz der Einordnung als „primitivste“ Metazoen verfügen Schwämme über zahlreiche Merkmale, die bislang nur höheren Tieren zugesprochen wurden (Müller & Müller 2003). Der Mechanismus der Reaggregation von dissoziierten Schwammzellen ist seit etwa 100 Jahren bekannt (Wilson 1907), aber erst in den letzten Jahren wurden biochemische Kenntnisse über die beteiligten Aggregationsfaktoren (Fernández-Busquets & Burger 2003, Carvalho de Souza et al. 2005, Garcia-Manyes et al. 2006) und ihre Expression auf Schwammzellen gewonnen (Fernández-Busquets et al. 2002). Die Aggregationsfaktoren

weisen eine hohe Spezifität auf, die eine Unterscheidung verschiedener Individuen innerhalb einer Schwammspezies ermöglicht (Fernández-Busquets et al. 1999). Bei Kontakt mit Fremdgewebe tritt eine Wanderung der Schwammzellen zur Kontaktstelle hin auf und es wird eine zelluläre Barriere gebildet. Für Archaeozyten in der Kontaktzone konnte die Einleitung der Apoptose anhand von Caspase-3-Expression nachgewiesen werden (Tepsuporn et al. 2003). Durch zelluläre Erkennungsmechanismen ist somit eine Art fundamentales Immunsystem realisiert (Wiens et al. 2005). Während eigene Zellen als selbst erkannt werden und aggregieren, findet für fremde Zellen eine starke Abwehrreaktion mit Nekrose des Gewebes an der Kontaktstelle statt.

## 2.3 Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme

### 2.3.1 Verteilung und Abundanz

Die ersten umfassenden Beschreibungen der Assoziation von Schwämmen mit Mikroorganismen erfolgten durch Vacelet an Schwämmen der Gattung *Aplysina* (1970, 1971, 1975). Nachfolgend wurde erkannt, dass eine Reihe weiterer Schwämme ebenfalls eine hohe Konzentration von Bakterien im Gewebe aufweisen, dass dies aber keine generelle Eigenschaft aller *Demospongiae* ist (Vacelet & Donadey 1977, Wilkinson 1978 I). Bei *A. aerophoba* liegen die Bakterien in sehr hoher Dichte extrazellulär in der ECM des Mesohyls vor und machen ~40 % des Gewebevolumens aus (Vacelet 1975, Wilkinson 1978 III). Die Zellkonzentrationen betragen  $6,4 \pm 4,6 \times 10^8$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm (Friedrich et al. 2001) und übersteigen damit die Bakterienkonzentration des natürlichen Seewassers um etwa 2 – 3 log-Stufen. Ähnlich hohe Zellzahlen von  $10^8 - 10^9$  Bakterien  $ml^{-1}$  Schwamm wurden auch für den australischen *Rhopaloeides odorabile* gefunden (Webster & Hill 2001). Elektronenmikroskopisch werden mindestens sieben bakterielle Morphotypen mit z. T. außergewöhnlichen Eigenschaften, wie Nucleoidmembranen beim Typ E, unterschieden (Vacelet 1975, Wilkinson 1978 III, Friedrich et al. 1999). Im äußeren, lichtexponierten Cortex-Bereich finden sich zahlreiche Cyanobakterien, diese liegen vereinzelt auch intrazellulär in „Cyanozyten“ vor (Wilkinson 1978 III). In tieferen Mesohylbereichen werden nicht photosynthetisch aktive Bakterien gefunden (Wilkinson 1978 I), diese vermutlich heterotrophen Bakterien machen den Hauptteil der assoziierten Mikroben aus. Darüber hinaus

wurden mit sehr geringer Häufigkeit filamentöse, in den Nuclei der Schwammzellen vorliegende Bakterien beschrieben (Vacelet 1970, Friedrich et al. 1999).

### 2.3.2 Phylogenetische Diversität

Eine Charakterisierung und Beschreibung von Bakterien erfolgte in den 80er und 90er Jahren durch numerische Taxonomie anhand von morphologischen Merkmalen und stoffwechselphysiologischen Leistungen (Wilkinson 1978 II, Wilkinson et al. 1981, Santavy et al. 1990). Die Kultivierbarkeit der Mikroorganismen war dabei eine grundlegende Voraussetzung und wird heute noch bei der Suche nach interessanten physiologischen Eigenschaften oder Bioaktivitäten (Hentschel et al. 2001, Thiel & Imhoff 2003) und zur Erweiterung von Stammsammlungen (Lopez et al. 1999, Olson et al. 2002, Pimentel-Elardo et al. 2003) vorausgesetzt.

Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass schätzungsweise >99 % der Umweltmikroben bislang nicht kultiviert werden können (Aman et al. 1995, Hugenholtz et al. 1998, Rappé & Giovannoni 2003). Ein Großteil dieser Vertreter kann jedoch durch die unterschiedlichen molekulargenetischen Methoden erfasst werden (Muyzer et al. 1993, Moeseneder et al. 1999, Muyzer 1999). Dadurch gelingt heute eine weitaus differenziertere Beschreibung der in der Umwelt vorliegenden Bakteriengemeinschaften (Hagström et al. 2002, Venter et al. 2004, Giovannoni & Stingl 2005). Sequenzanalysen und Vergleiche von Marker-Genen wie 16S rRNA, recA, rpoB, hsp 70 u. a. erlauben die Berechnung von Ähnlichkeitsverhältnissen und schließlich die phylogenetische Zuordnung von Sequenzen. Am geläufigsten ist der Sequenzvergleich für das 16S rRNA-Gen, da hier die meisten Referenzsequenzen vorliegen. Etwa die Hälfte aller heute bekannten bakteriellen Phyla sind Candidatus-Phyla, die bislang keine kultivierbaren Vertreter haben (Keller & Zengler 2004). Die Molekulargenetik bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Vorhersagen über physiologische Leistungen und Qualitäten der Bakterien zu treffen, ohne eine Kultivierung vorzunehmen (Freitag & Prosser 2004, Sabehi et al. 2004, Treusch et al. 2005, Fieseler et al. 2006, Hallam et al. 2006).

Für marine Schwämme wurde mittels molekulargenetischer Methoden eine hohe Diversität assoziierter Bakterien beschrieben, auch Archaeobakterien konnten nachgewiesen werden (Preston et al. 1996, Webster et al. 2001 I). Die aus Sequenzdaten abgeleitete Diversität übertraf die der kultivierbaren Isolate der jeweiligen Schwämme bei weitem

(Hentschel et al. 2003, Imhoff & Stöhr 2003). Für einige Schwämmen werden bakterielle Sequenzen nachgewiesen, die überwiegend den Phyla zugeordnet werden, die auch am bakteriellen Seewasserkonsortium beteiligt sind. Die über Denaturierende Gradient Gel Elektrophorese für diese Schwämme nachweisbare Diversität ist im Vergleich zu *A. aerophoba* relativ gering (Taylor et al. 2004, Webster et al. 2004). Darüber hinaus wurde eine Variabilität dieser bakteriellen Gemeinschaften beim Vergleich von Individuen einer Schwammspezies aus verschiedenen Klimazonen gezeigt (Taylor et al. 2005). Für diese Schwamm-Bakterien-Assoziationen bleibt zu zeigen, ob es sich um spezifische, im Mesohyl vorliegende Bakterien, entsprechenden den elektronenmikroskopischen Beschreibungen, oder um Epibionten handelt. So erbrachte die mikroskopische Untersuchung des Süßwasserschwamms *Spongilla lacustris* keine Indizien für das Vorliegen von Bakterien im Gewebe. Diesen Ergebnissen entsprechend wurden durch die molekulargenetische Untersuchung nur bakterielle Phylotypen nachgewiesen, die, mit Ausnahme von zwei außergewöhnlichen  $\alpha$ -Proteobakterien, auch im umgebenden Wasser vertreten waren (Gernert et al. 2005).

Im Gegensatz dazu wurde für Schwämme, die eine hohe Anzahl von Bakterien in ihrem Mesohyl aufweisen, eine wesentlich höhere bakterielle Diversität beschrieben (Webster et al. 2001 II, Hentschel et al. 2002, Hentschel et al. 2003, Fieseler 2005). Während diese Phylotypen im umgebenden Seewasser nicht nachweisbar waren, verfügten verschiedene Schwammspezies aus verschiedenen Habitaten jeweils über Phylotypen aus bestimmten gemeinsamen schwammspezifischen „cluster“ (Hentschel et al. 2002), die monophyletischen Ursprungs waren. Für assoziierte Cyanobakterien wurden zahlreiche Phylotypen beschrieben, von denen ein Großteil einer monophyletischen Abstammungsgruppe zugehörte und am wahrscheinlichsten spezifisch mit Schwämmen assoziiert ist (Steindler et al. 2005). Einige „cluster“ entstammen bislang oftmals nur gering charakterisierten bakteriellen Phyla wie z. B. den *Chloroflexi*, *Acidobacteria* oder *Gemmatimonadetes*, deren Vertreter im hochselektiven Milieu des Schwammgewebes eine spezielle ökologische Nische besiedeln (Hentschel et al. 2006). Darüber hinaus wurde erst kürzlich das „candidatus-Phylum“ *Poribacteria* entdeckt (Fieseler et al. 2004, Fieseler 2005). Die *Poribacteria* liegen in hoher Zahl im Mesohyl von *A. aerophoba* vor und konnten bislang nur in Schwämmen nachgewiesen werden (Fieseler, persönliche Kommunikation). Die Kultivierung solcher über 16S rRNA-Analysen beschriebenen Vertreter der Konsortien war bislang nicht erfolgreich. Lediglich ein  $\alpha$ -Proteobakterium wurde aus *R. odorabile* isoliert, dessen Lokalisation im Mesohyl nachgewiesen werden konnte. Dieses Bakterium trug jedoch nur etwa 0,02 % zum bakteriellen Konsortium des Schwamms bei und kann deshalb nicht als repräsentativ

angesehen werden (Webster & Hill 2001). Phylogenetisch nah verwandte Isolate wurden auch für andere Schwämme beschrieben (Hentschel et al. 2001, Olson et al. 2002, Lafi et al. 2005), sodass es sich um schwammspezifische, aber wenig abundante Vertreter handeln dürfte.

### 2.3.3 Mögliche Symbiosefunktionen

Aufgrund des evolutionären Alters der Schwämme und der schon seit langem vermuteten Exklusivität der assoziierten Bakterienarten wurde über eine evolutionär sehr alte Interaktion spekuliert (Wilkinson 1987 I, Wilkinson 1984). Die Assoziation liegt bei allen Individuen einer Art vor und weist außerordentliche Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen auf. Weder durch Applikation von Antibiotika oder durch Hungerstress (Friedrich et al. 2001) noch durch Versetzung der Schwämme (Thoms et al. 2003) tritt eine wesentliche Veränderung des Konsortiums auf. Lediglich durch Zugabe sublethaler  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen erfolgt eine sukzessive Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft (Webster et al. 2001 III). Die Assoziation scheint obligaten Charakter zu haben, da für ausgewählte Schwämme die vertikale Weitergabe der Bakterien über die Embryonalstadien nachgewiesen werden konnte (Gallissian & Vacelet 1976, Usher et al. 2001, Usher et al. 2005, Wehrl in Vorbereitung.).

Die Funktion des Schwamms für die Bakterien dürfte in der zur Verfügungstellung eines gegen Umwelteinflüsse geschützten Habitats (Osinga et al. 2001, Hentschel et al. 2006) und der Bereitstellung von z. B. stickstoffhaltigen Stoffwechselprodukten liegen (Bayer in Vorbereitung). Die Funktion der Bakterien für den Schwamm ist noch weitgehend unbekannt. Lediglich für die gut charakterisierten Cyanobakterien (Carr 1982, Bryant 1995) gibt es stichhaltige Hinweise auf symbiontische Funktionen. Mikroskopisch konnte die Abgabe von Assimilat der Cyanobakterien nachgewiesen werden (Vacelet 1971). Darüber hinaus wurde in der Assoziation mit dem Schwamm eine Nettoproduktion von  $\text{O}_2$  und eine Fixierung von  $\text{CO}_2$  gezeigt (Wilkinson 1983 I). Der Einfluss der Cyanobakterien auf die Ernährungsphysiologie der Schwämme wird deutlich beim Vergleich von cyanobakterienhaltigen und -freien Schwammspezies. Bakterienhaltige Arten zeigten eine vergleichsweise geringe Filtration von Partikeln, da sie vermutlich einen Teil ihres Energiebedarfs mit Hilfe der bakteriellen Assimilate decken können (Wilkinson et al. 1988). Dies ermöglicht die Besiedlung von Habitaten mit bakterienarmen Wasser, wie dem Great Barrier Reef. Die Schwammpopulation wird hier von cyanobakterienhaltigen Spezies dominiert (Wilkinson 1983 I, Wilkinson 1987 II). Ein stark positiver Einfluss der Lichtexposition auf das Wachstum von *A. aerophoba*



konnte unmittelbar nachgewiesen werden (Wilkinson & Vacelet 1979). Über den photosynthetischen Effekt hinaus wird ferner diskutiert, ob die Absorption der bakteriellen Chlorophylle auch eine Art Strahlenschutz gegenüber dem Sonnenlicht darstellen könnte (Sarà 1964, Sarà 1971, Wilkinson 1980). Da Stickstoffverbindungen in aquatischen Systemen limitiert sind, könnte eine weiter bedeutende Symbiosefunktion in der nachgewiesene Fixierung von  $N_2$  durch die Cyanobakterien liegen (Wilkinson & Fay 1979).

Für die möglichen Funktionen der heterotrophen Mesohylbakterien gibt es bislang weder stichhaltige Hinweise noch Indizien. Molekulargenetische Untersuchungen mittels der gegen 16S rRNA gerichteten Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ergaben helle Fluoreszenzsignale. Dies wurde als Hinweise für die metabolische Aktivität der Mikroben gedeutet (Fieseler et al. 2004). Die bei ausgewählten bakterienhaltigen Schwämmen nachgewiesene geringe Sauerstoffkonzentration im Mesohyl könnte ebenfalls ein Indiz für den Metabolismus der Bakterien sein (Hoffmann et al. 2005, Weisz 2006). Daraus könnten sich indirekte Auswirkungen auf die Cyanobakterien ergeben, insofern, dass bei geringer  $O_2$ -Konzentration die Fixierung von  $N_2$  gefördert wird und die Exkretion von Assimilat stimuliert wird (Wilkinson & Fay 1979). Für die Mesohylbakterien gibt es jedoch nur punktuelle Hinweise auf die verwendeten Stoffwechselwege oder Produkte. Es wurde in Erwägung gebracht, dass diese Mikroben allgemein bei der Umsetzung von Stoffwechselendprodukten der Schwämme beteiligt sein könnten (Wilkinson 1978 II, Wilkinson et al. 1981). So konnte für *Haliclona cymiformis* gezeigt werden, dass eine assoziierte Rotalge die vom Schwamm abgegebenen Ammoniumionen aufnimmt, was funktionell zu einer Detoxifikation des Gewebes beitragen könnte (Davy et al. 2002). Für bakterienhaltige Schwämme wurde eine starke Abgabe von Nitrat- und Nitriten nachgewiesen, während bakterienarme Schwämme nur geringe Mengen dieser oxidierten Verbindungen abgeben (Corredor et al. 1988) oder alternativ Ammoniumionen exkretieren (Bayer in Vorbereitung). Es wird vermutet, dass die Oxidation der Stickstoffverbindungen durch nitrifizierende Vertreter der Mesohylbakterien, wie *Nitrospira*-Arten geleistet wird, die molekulargenetisch bereits in *A. aerophoba* nachgewiesen wurden (Hentschel et al. 2002). Des Weiteren wurde häufig diskutiert, dass Mesohylbakterien bei der Synthese von Sekundärstoffen beteiligt sein könnten. Schwämme sind eine der reichhaltigsten Quellen für Sekundärstoffe (Proksch et al. 2002, Blunt et al. 2006), die häufig über eine starke Bioaktivität verfügen (Müller et al. 1985, Teeyapant et al. 1993) und der chemischen Verteidigung dienen könnten (Pawlik et al. 1995, Assmann et al. 2000). Die hohe Anzahl gefundener chemischer Verbindungen und deren hohe strukturelle Diversität wird häufig in Zusammenhang mit der komplexen bakteriellen Assoziation

gebracht. Für einige Schwammspezies konnten charakteristische Schwammsekundärstoffe tatsächlich in den assoziierten Prokaryoten nachgewiesen werden. So wurde Swinholid A in fraktionierten heterotrophen Symbiontenzellen von *Theonella swinhoei* gefunden (Bewley et al. 1996). Nachfolgend konnte Swinholid A jedoch auch in freilebenden Cyanobakterien nachgewiesen werden (Andrianasolo et al. 2005). Somit bleibt fraglich, ob die Sekundärstoffe tatsächlich von spezifisch assoziierten Mikroben synthetisiert werden. Während in zahlreichen Fällen Hinweise auf eine bakterielle Beteiligung hindeuten (Flowers et al. 1998), fehlen bislang stichhaltige Beweise (König et al. 2006).

Für ausgewählte Schwämme wurde eine Korrelation zwischen Gewebekonsistenz und Symbiontendichte im Mesohyl beschrieben (Wilkinson 1978 I). Es wurde diskutiert, ob die Mesohylbakterien als eine Art extrazelluläre Füllmasse eine mechanische Funktion als Stützelement einnehmen könnten, was einen größeren Habitus ermöglichen könnte (Wilkinson et al. 1981). Darüber hinaus scheinen Mesohylbakterien bei der Aufnahme gelöster Stoffe aus dem Wasser beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass lösliche Kohlenstoffverbindungen zunächst in den Mikroben nachweisbar sind und erst nachfolgend, vermutlich durch Phagozytose der Prokaryoten, in die Schwammzellen gelangen (Wilkinson & Garrone 1980). Eine solche zunächst mikrobielle Prozessierung von Stoffen mit nachfolgender Aufnahme durch den Wirt ähnelt funktionell der Mikroflora des Pansens der Wiederkäuer und könnte einer Erweiterung des nutzbaren Nahrungsspektrums dienen (Varga Kolver 1997, Russel & Rychlik 2001).

Wie ausgeführt, sind zahlreiche Funktionen mit einem gegenseitigen Gesamtnutzen für die Assoziation von Schwämmen mit Mikroorganismen vorstellbar. Obwohl bisher keine schlagenden Funktionsbeweise für eine echte Symbiose erbracht werden konnten, deutet die artkonstante Assoziation, die Stabilität über Raum und Zeit und die spezifische Zusammensetzung des bakteriellen Konsortiums auf eine echte Symbiose hin. Ferner spricht die vertikale Weitergabe der Bakterien für eine evolutionär alte, spezifische und obligate Interaktion. Aus diesen Gründen werden die schwammassozierten Bakterien, unter Beachtung des noch fehlenden Funktionsbeweises, in dieser Arbeit nachfolgend als Symbionten bezeichnet.

## 2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Filtration und Aufnahme von Mikroorganismen stellt wahrscheinlich die evolutionär älteste Interaktion von Metazoen mit Prokaryoten dar. Neben dieser episitistischen Interaktionsform sind zahlreiche Schwämme mit einer sehr hohen Anzahl von Mikroorganismen assoziiert, die in der extrazellulären Matrix des Tieres vorliegen. Bislang ist unverständlich, wie die als Symbionten bezeichneten Bakterien im Gewebe in unmittelbarer Nähe der phagozytoseaktiven Schwammzellen überleben können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Mechanismen der Interaktion zwischen *Demospongiae* und Bakterien experimentell untersucht werden.

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen verschiedener Schwammspezies sollte ermittelt werden, ob unterschiedliche Muster der Bakterienhaltigkeit in marinen Schwämmen vorliegen. Aufgrund der Ergebnisse sollten geeignete Modellspezies für bakterienhaltige und bakterienarme Schwämme ausgewählt werden. Durch experimentelle Untersuchung der bakteriellen Aufnahme der Tiere sollte überprüft werden, ob bakterienhaltige Schwämme in der Lage sind, zwischen ihren eigenen Symbionten und „Futterbakterien“ zu differenzieren. Die Aufnahme von Schwammsymbionten sollte der Aufnahme von Seewasserbakterien und dem als Modellorganismus für „Futterbakterien“ dienenden Isolat *Vibrio* sp. SB177 gegenübergestellt werden. Parallel sollten Experimente mit bakterienfreien Schwämmen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob diese eine Selektivität für Schwammsymbionten aufweisen. Mittels DGGE sollte die Veränderung der phylogenetischen Zusammensetzung des Seewasser- und des Symbiontenkonsortiums während der Filtration der Schwämme analysiert werden, um eine mögliche Selektivität der Schwämme gegenüber bestimmten phylogenetischen Bakterientaxa feststellen zu können. Die Mechanismen der internen Prozessierung aufgenommener „Futterbakterien“ sollten an dem GFP-markierten *Vibrio* sp. MMW1 und an inerten Latex Beads fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Aufnahme und Prozessierung von markierten Schwammsymbionten überprüft werden. Durch diese verschiedenen experimentellen Ansätze sollten neue Kenntnisse über die Mechanismen erhalten werden, die bei der Ausbildung stabiler bakterieller Konsortien im Gewebe mariner Schwämme beteiligt sind.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Organismen

##### 3.1.1.1 Schwämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Schwämme sind in der Tabelle 3.1.1 mit Sammelort und Sammeldatum aufgelistet:

**Tab. 3.1.1:** Untersuchte Schwammspezies.

Spezies	Ort	Datum
<i>Agelas citrina</i>	Little San Salvador, Bahamas	06/2002
<i>Agelas dilatata</i>	Little San Salvador, Bahamas	07/2003
<i>Agelas wiedenmayeri</i>	Key Largo, USA	06/2002
<i>Aplysina aerophoba</i>	Banyuls-sur-Mer, Frankreich Rovinj, Kroatien	04/2002, 04/2003 08/2003, 06/08/2004, 05/2005
<i>Aplysina archeri</i>	Key Largo, USA	06/2002
<i>Aplysina cauliformis</i> , var. dünn	Chub Cay, Bahamas	06/2002
<i>Aplysina cauliformis</i> , var. dick	San Salvador, Bahamas	06/2002
<i>Aplysina cavernicola</i>	Marseille, Frankreich	10/2003
<i>Aplysina fistularis</i>	Grand Bahamas Island, Bahamas	06/2002
<i>Aplysina insularis</i>	San Salvador, Bahamas	06/2002
<i>Aplysina lacunosa</i>	Key Largo, USA	06/2002
<i>Axinella polypoides</i>	Rovinj, Kroatien	08/2004
<i>Callyspongia vaginalis</i>	Key Largo, USA	09/2002
<i>Chalinula molytba</i>	Grand Bahamas Island, Bahamas	07/2002
<i>Chondrosia reniformis</i>	Rovinj, Kroatien	05/2005
<i>Crambe crambe</i>	Banyuls-sur-Mer, Frankreich	04/2003
<i>Dysidea avara</i>	Rovinj, Kroatien	08/2004, 05/2005
<i>Iotrochota birotulata</i>	Little San Salvador, Bahamas	07/2003
<i>Ircinia felix</i>	Key Largo, USA	09/2002
<i>Monanchora arbusculum</i>	Chub Cay, Bahamas	06/2002
<i>Mycale laxissima</i>	Key Largo, USA	06/2002
<i>Niphates digitalis</i>	Key Largo, USA	09/2002
<i>Niphates erecta</i>	Key Largo, USA	09/2002
<i>Ptilocaulis</i> sp.	San Salvador, Bahamas	07/2003
<i>Smenospongia aurea</i>	Key Largo, USA	06/2002

**Fortsetzung Tab. 3.1.1:** Untersuchte Schwammspezies.

Spezies	Ort	Datum
<i>Sphaciospongia cuspidifera</i>	Long Island, Bahamas	6/2002
<i>Suberites domuncula</i>	Rovinj, Kroatien	08/2004
<i>Tedania ignis</i>	Key Largo, USA	06/2002
<i>Tethya aurantium</i>	Rovinj, Kroatien	06/2004, 08/2004, 05/2005
<i>Ulosa ruetzleri</i>	Key Largo, USA	06/2002
<i>Verongula gigantea</i>	San Salvador, Bahamas	07/2003
<i>Xestospongia muta</i>	Key Largo, USA	09/2002

### 3.1.1.2 Marine bakterielle Isolate

Die verwendeten marinen Bakterienstämme sind in Tabelle 3.1.2 zusammengefasst:

**Tab. 3.1.2:** Marine Bakterienisolate.

Isolat	Herkunft, Eigenschaft	Referenz
$\alpha$ -Proteobacterium SB89	schwammassoziiert, Banyuls, Frankreich	†, AF218241
<i>Vibrio</i> sp. SB177	schwammassoziiert, Banyuls, Frankreich	†, AF218244
<i>Vibrio</i> sp. MMW1	<i>Vibrio</i> sp. SB177 (pKV111; rsGFP; Cm <sup>R</sup> )	diese Arbeit
<i>Vibrio fischeri</i> ES114	Tintenfisch-Symbiont, Hawaii, USA	‡, CP000020-22
<i>Vibrio fischeri</i> DM61	(pKV111; Cm <sup>R</sup> ) Hyperswimmer class III	‡
<i>Vibrio fischeri</i> DM131	(pKV111, Cm <sup>R</sup> ; Km <sup>R</sup> ) $\Delta$ Hap2 w/o flagellae,	*
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SB200	schwammassoziiert, Banyuls, Frankreich	†, AF218246
<i>Bacillus</i> sp. SB144	schwammassoziiert, Banyuls, Frankreich	†, AF218243

†: Hentschel et al. 2001; ‡: Millikan & Ruby 2002; \*: persönl. Kommunikation D.S. Millikan

### 3.1.1.3 *Escherichia coli*-Laborstämme

Für molekulargenetische Arbeiten verwendete *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 3.1.3 aufgelistet:

**Tab. 3.1.3:** *E. coli*-Laborstämme und ihre genetischen Eigenschaften.

Stamm	Eigenschaft	Referenz
<i>E. coli</i> K12 (DH5 $\alpha$ )	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan 1983
<i>E. coli</i> MM294	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1</i> $\lambda$ <i>relA1?</i> <i>rfbD1? spoT1?</i>	ATCC33625 ATCC39607

### 3.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 3.1.4 aufgeführt:

**Tab. 3.1.4:** Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pRK2013	Km <sup>R</sup> ; oriColE1; RK2-Mob <sup>+</sup> ; RK-Tra <sup>-</sup>	Figurski et al. 1979
pKV111	Cm <sup>R</sup> ; rsGFP	Millikan & Ruby 2002
pGEM®-T Easy	Amp <sup>R</sup> ; lacZ; T7- und SP6-Promotor, fl ori	Promega Corp., USA

### 3.1.3 Oligonukleotid-Primer

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech bezogen und sind in Tabelle 3.1.5 aufgeführt:

**Tab. 3.1.5:** Oligonukleotid-Primer mit Sequenz und Schmelztemperatur und GC-Gehalt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> [°C]	GC [%]	Ref.
27f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA	53,7	50,0	‡
341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	64,7	70,6	‡
534r	ATT ACC GCG GCT GCT GG	57,6	64,7	‡
907r	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	52,2	37,5	‡
1385r	CGG TGT GT(AG) CAA GGC CC	58,8	67,6	‡
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG	55,9	42,9	†
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	46,9	33,3	†
GC-clamp	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C	--	100	‡

Die GC-clamp wird bei der DGGE-PCR vor dem 5'-Terminus eines Primers angehängt.

‡: Muyzer et al. 1998; †: Promega Corp., USA

### 3.1.4 DNA-Größen- und Mengenstandards

- Größenstandard: GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, 0,5 µg / µl,  
MBI Fermentas, Nr.: SM0311  
10 Kbp, 8 Kbp, 6 Kbp, 5 Kb, 4 Kbp, 3,5 Kbp, 3 Kbp, 2,5 Kbp, 1,5 Kbp, 1 Kbp,  
750 bp, 500 bp, 250 bp

- Größenstandard: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 0,5 µg / µl,  
MBI Fermentas, Nr.: SM0241  
1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp,  
80 bp
- DNA-Mengenstandard: MassRuler™ DNA Ladder Mix,  
MBI Fermentas, Nr.: SM0403  
10 Kbp / 10 ng µl<sup>-1</sup>, 8 Kbp / 8 ng µl<sup>-1</sup>, 6 Kbp / 6 ng µl<sup>-1</sup>, 5 Kbp / 5 ng µl<sup>-1</sup>, 4 Kbp /  
4 ng µl<sup>-1</sup>, 3 Kbp / 3 ng µl<sup>-1</sup>, 2,5 Kbp / 2,6 ng µl<sup>-1</sup>, 2 Kbp / 2 ng µl<sup>-1</sup>, 1,5 Kbp / 1,6 ng µl<sup>-1</sup>,  
1031 bp / 10 ng µl<sup>-1</sup>, 900 bp / 9 ng µl<sup>-1</sup>, 800 bp / 8 ng µl<sup>-1</sup>, 700 bp / 7 ng µl<sup>-1</sup>, 600 bp /  
6 ng µl<sup>-1</sup>, 500 bp / 10 ng µl<sup>-1</sup>, 400 bp / 4 ng µl<sup>-1</sup>, 300 bp / 3 ng µl<sup>-1</sup>, 200 bp / 2 ng µl<sup>-1</sup>,  
100 bp / 1 ng µl<sup>-1</sup>, 80 bp / 0,8 ng µl<sup>-1</sup>

### 3.1.5 Chemikalien

Die bei der Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Becton Dickinson (BBL, Difco), Fluka Chemica, Merck, Carl Roth, Sigma, Molecular Probes, Polysciences, Roche, Qiagen, MBI Fermentas, New England Biolabs und Invitrogen bezogen und nach Angaben der Hersteller verwendet.

### 3.1.6 Fluorochrome

Für die analytische Anfärbung von DNA und für die Mikroskopie verwendete Fluorochrome sind in Tabelle 3.1.6 zusammengefasst:

**Tab. 3.1.6:** Spektrale Eigenschaften verwendeter Fluorochrome und ihre Anwendung.

Farbstoff	Exc <sub>max</sub> [nm]	Em <sub>max</sub> [nm]	Anwendung
Acridinorange	460	650 (RNA) / 520 (DNA)	DNA / RNA
Alexa Fluor 546	546	572	AK-Kopplung, etc.
DAPI	359	461	DNA
Ethidiumbromid	510, 523 (260 DNA)	595, 605	DNA
FAM/SE	494	518	Proteinfärbung
Fluorescein	495	520	divers
Propidiumiodid	(305) 536, 538	617	DNA
rsGFP	498	516	Zell. Fluorochrom
SYBR Gold	495	537	DNA / RNA
SYBR Green I	497	520	DNA
SYBR Green II	497	520	RNA / ssDNA
TAMRA/SE	555	580	Proteinfärbung



### 3.1.7 Antibiotika und Substratanaloga

Verwendete Antibiotika und Substratanaloga sowie Lösungsmittel (LM) sind in Tabelle 3.1.7 zusammengefasst. Stocklösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tab. 3.1.7:** Antibiotika und Substratanaloga.

Substanz	Stock-Lösung (LM)	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg ml <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	100 µg ml <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	25,0 mg ml <sup>-1</sup> (EtOH)	5,00 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	100 mg ml <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	100 µg ml <sup>-1</sup>
Streptomycin	100 mg ml <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	100 µg ml <sup>-1</sup>
IPTG	23,8 mg ml <sup>-1</sup> ( $\cong$ 100 mM) (H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	23,8 µg ml <sup>-1</sup> ( $\cong$ 100 µM)
X-Gal	20,0 mg ml <sup>-1</sup> (Dimethylformamid)	20,0 µg ml <sup>-1</sup>

### 3.1.8 Medien für die Anzucht von Bakterien

- Zobell-Agar und Medium (entspricht BD Difco<sup>TM</sup> marine broth 2216, Nr.: 279110)

Pepton	5,00 g
Hefeextrakt	1,00 g
ASW	750 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	250 ml
Agar	15,0 g
für Flüssigmedium Ansatz ohne Agar	

- LB (Luria-Bertani)-Agar und Medium

Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	5,00 g
Agar	14,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l
für Flüssigmedium Ansatz ohne Agar	

- AIX-Agar (Ampicillin-IPTG-X-Gal-Agar)

LB-Agar	1,00 l	
zum autoklavierten Agar werden bei $\sim 45^{\circ}\text{C}$ hinzugeben:		
Ampicillin-Stock-Lsg.	1,00 ml	(End-Konz.: 100 µg ml <sup>-1</sup> )
IPTG-Stock-Lsg.	1,00 ml	(End-Konz.: 23,8 µg ml <sup>-1</sup> )
X-Gal-Stock-Lsg.	1,00 ml	(End-Konz.: 20,0 µg ml <sup>-1</sup> )

### 3.1.9 Allgemeine Lösungen

- Artifizielles Seewasser (ASW), Lyman und Flemming, 1940

NaCl	23,5 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,92 g
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	10,6 g
CaCl <sub>2</sub>	1,10 g
NaHCO <sub>3</sub>	192 mg
KCl	664 mg
KBr	96,0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	26,0 mg
SrCl <sub>2</sub>	24,0 mg
NaF	3,00 mg
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l

- CMFASW (Ca<sup>2+</sup> - / Mg<sup>2+</sup> -freies Seewasser), Rottmann et al. 1987

NaCl	27,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00 g
KCl	0,80 g
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	0,18 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l

- CMFASW-E (Ca<sup>2+</sup> - / Mg<sup>2+</sup> -freies Seewasser mit 50 mM EDTA), Rottmann et al. 1987

CMFASW	900 ml
0,5 M EDTA, pH = 8,0	100 ml

- 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lsg.

CaCl <sub>2</sub>	111 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l

- 5 M NaCl-Lsg.

NaCl	292 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l

- 3 M Natriumacetat-Lsg., pH = 4,8

C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na	246 g
mit Essigsäure pH = 4,8 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l

- 1 M Glucose-Lsg.

Glucose	180 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l
Lösung steril filtrieren	

- 1 M Fructose-Lsg.

Fructose	180 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l
Lösung steril filtrieren	
  
- 5x PBS-Lsg.

NaCl	40,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	6,25 g
KCl	1,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l
  
- Papain-Stock-Lsg.

Papain (AppliChem, Nr: A3824)	5,00 mg
Cystein	50,0 mg
ASW	ad 1,00 ml
  
- Proteinase K-Stock-Lsg.

Proteinase K, Sigma, Nr.: P2308	1,00 mg
ASW	ad 1,00 ml
  
- 0,5 M EDTA-Lsg., pH = 8,0

EDTA-Na <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	186 g
mit 10 N NaOH-Lsg. pH = 8,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l
  
- 1 M Tris / HCl-Puffer, pH = 8,0

Tris-Base	121 g
mit HCl <sub>cc</sub> pH = 8,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l
  
- 50x TAE-Puffer

Tris-Base	242 g
Essigsäure, 100%	60,0 ml
0,5 M EDTA (pH = 8,0)	100,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1 l
  
- 10 N NaOH-Lsg.

NaOH	400 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	ad 1,00 l

- Lysepuffer A

Glucose	50,0 mM
Tris / HCl, pH = 8,0	25,0 mM
EDTA, pH = 8,0	10,0 mM

- Lysepuffer B

NaOH	200 mM
SDS	1,00 %

- 10% CTAB-Extraktionslösung

CTAB	10,0 g
NaCl	0,7 M
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 100 ml

- 10% SDS / H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

- 10% APS (Ammoniumpersulfat) in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

- Acrylamid-Lösungen unterschiedlicher Denaturierungsgrade für DGGE

Tabelle 3.1.8 fasst die Zusammensetzung von Acrylamid-Gelen mit unterschiedlichen Denaturierungsgraden zusammen:

**Tab. 3.1.8:** Zusammensetzung denaturierender Acrylamid-Gele.

<b>Acrylamid-Gel, 10% (w / v), 100 ml</b>	
40 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 / 1)	25,0 ml
50x TAE-Puffer	2,00 ml
Formamid	x [ml]
Harnstoff	y [g]
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 100 ml

<b>Denaturierungsgrad</b>	<b>Formamid</b>		<b>Harnstoff</b>	
	<b>x [ml]</b>	<b>M</b>	<b>y [g]</b>	<b>M</b>
100	40,0	1,0	42,0	7,0
80	32,0	0,8	33,6	5,6
20	8,00	0,2	8,40	1,4
0	0	0	0	0

- 10x DNA-Laufpuffer für Agarose-Gele
 

Bromphenolblau	250 mg
Xylencyanol	250 mg
Ficoll 400	1,50 g
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 100 ml
  
- 2x DNA-Laufpuffer für DGGE
 

Bromphenolblau	50,0 mg
Xylencyanol	50,0 mg
Glycerin, 86%	81,4 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 100 ml
  
- 0,5 % Fluorescein in ASW

### 3.1.10 Material und Lösungen für die Mikroskopie

- Eindeckmittel
 

Citifluor A2, Citifluor Ltd., London
  
- Latex Beads
  - Fluoresbrite™ YG plain Microspheres 1,00 µm, ( $\lambda_{Exc}$ : 441 nm,  $\lambda_{Em}$ : 486 nm)  
Polysciences, Nr.: 17154
  - Fluoresbrite™ BB Carboxylated Microspheres 1,00 µm, ( $\lambda_{Exc}$ : 360 nm,  $\lambda_{Em}$ : 407 nm)  
Polysciences, Nr.: 17458
  
- Einbettmittel für Kryomikrotom
 

Tissue-Tek, Sakura, NL
  
- TAMRA/SE-Stocklösung
 

TAMRA/SE	1,00 mg
DMSO	ad 1,00 ml

TAMRA/SE: Molecular Probes, Nr.: C-1171
  
- FAM/SE-Stocklösung
 

FAM/SE	2,00 mg
DMSO	ad 1,00 ml

FAM/SE: Molecular Probes, Nr.: C-1311

- 1% BSA in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  
- Phalloidin-Stocklösung (6,6 µM)
 

Phalloidin gekoppelt mit Alexa Fluor 546	11,9 µg
1 x PBS	ad 1,00 ml
  
- Carnoy-Fixans
 

Ethanol 100 %	600 ml
Trichlormethan	300 ml
Essigsäure 100 %	100 ml
  
- 50 mM Cacodylat / 2,5 % Glutaraldehyd-Fixans
 

Na-Cacodylat	1,07 g
mit HCl <sub>dil</sub> pH = 7,8 einstellen	
25 % Glutaraldehyd	10,0 ml
ASW	ad 100 ml
  
- 2,5% Glutaraldehyd / ASW
  
- 2% Osmiumtetroxid / ASW
  
- 2% Uranylacetat in EtOH
  
- Reynold's-Bleicitrat-Lsg.
 

Bleinitrat	2,66 g
Natriumcitrat * 2H <sub>2</sub> O	3,52 g
10 N NaOH	16,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 100 ml
  
- Glycidether 100 (alte Bezeichnung: Epon 812)
 

Glycidether 100	53,7 g
Härter DBA	35,6 g
Härter MNA	24,7 g
Beschleuniger DMP-30	2,00 g

DBA: 2-Dodecenyldersteinsäureanhydrid
MNA: 1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid
DMP-30: 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)-phenol
  
- Photopapier
 

BROVIRA-SPEED, Gradation 1 – 5, Agfa
--------------------------------------

- Entwickler  
     RODINAL B & W Film Developer, Agfa
  
- Fixierer  
     Superfix, Tetenal

### 3.1.11 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 3.1.9 aufgelistet:

**Tab. 3.1.9:** Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Abzüge	Köttermann	
	Prutscher	
Aquarium	julabo	7 A
Aquariumpumpen	Hagen	AquaClear 1000
	Hagen	PRO 2 Powerhead
	RENA	Rena Flow 300 C
	Vita Kraft	Vita Tech 300
Autoklaven	Fedegari	Tec 120
		9191E
		FV 3.3
	H+P Labortechnik	Varioklav 500
		Varioklav 135S
Brutschränke	Heraeus	Kelvitron® t
	Memmert	TV40b
CLSM – Scanmodul	ZEISS	LSM510
Mikroskop		Axiovert 100 M
Quecksilberdampfampe		HAL 100
Objektive		Plan-Neofluar 10x / 0,30
		Plan-Neofluar, Öl 40x / 1,30
		Plan-Apochromat, Öl 63x / 1,40
		LD Achroplan 63x / 0,75 Korr.
Lasersteuerung		ECU
Lasermodul		LSM5
Helium-Neon Laser 1	Lasos	543 nm, 5 mW
Helium-Neon Laser 2	Lasos	633 nm, 15 mW
Argon-Laser	Lasos	458, 488, 514 nm, Σ: 25 mW
Destillieranlage für H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	GFL	Bi-Dest 2304
Eismaschine	Scotsman	AF30
Elektronenmikroskope	ZEISS	EM10
	ZEISS	EM800
Elektrophoresekammern		
Agarose-Gele	BioRad	-
DGGE-Gele	BioRad	DCode™ Universal Mutation Detection System

**Fortsetzung Tab. 3.1.9:** Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Feinpipetten		
1000, 200, 20 µl	Gilson	Pipetman
10 µl	Eppendorf	Reference®
Feinwaage	Chyo Balance Corp.	JL-180
Filterapparaturen	Nalgene	Ø 47 mm Nr.: 300-4050
	Sartorius	Ø 25 mm Nr.: 516-7015
Fluoreszenzmikroskop	ZEISS	Axiolab
Quecksilberdampfampe		HBO 50
Objektive		Plan-Apochromat 10x / 0,30
		Plan-Apochromat 20x / 0,50
		Plan-Apochromat 40x / 0,75
		Plan-Apochromat, Öl 40x / 1,30
		Plan-Apochrom., Öl 100x / 1,30
Fluoreszenzfilter-Set	AF-Analysentechnik	1: BP365 / LP 397
		2: 450 – 490 / 515-565
		3: 530 – 585 / LP615
		4: BP620 / LP700
Kamerasystem	Intas	MP Focus5000
Gefrierschränke		
-20°C	Liebherr	Öko super
-80 °C	Nunc	QBF 2185V36
	Kendro	Queue Basic QBF 2585V36
Geldokumentationsanlage	BioRad	GelDoc 2000
Gradientengießer	BioRad	Gradient Delivery System, Model 475
Handvakuumpumpe	Nalgene	Nr.: 6133 -0010
Handzähler	IVO	-
Heizblock für RGs	2099-DA	Liebisch
Heizplatte mit Rührer	Labinco	L32
Kühlschrank	Privileg	Superöko
Laser-Imager	Amersham	Typhoon 8600
Membranfilter		
Polycarbonat, Ø 47 mm, 200 nm	Sartorius	PC MB 47MM 0.2UM
Polycarbonat, Ø 25 mm, 200 nm	Millipore	GTBP02500
Cellulose-Mischester, Ø 25 mm, 200 nm	Millipore	HABP02500
Mikroskop-Zählgitter	ZEISS	10 x 10 Kleinfelder, 12,5 mm
Mikrotome		
Gefriermikrotom	MICROM	HM 500 OM
Ultramikrotome	C.Reichert, Austria	OM U3
	RMC	MT-7000 ULTRA
Mikrowelle-Ofen	Privileg	8020
Mixer	GLW	L 46
	Scientific Ind.	Vortex Genie 2
Mörser / Pistill	Haldenwanger	Mörser55-#4, Pistill56-#4
Nalgene-Gefäß	Nalgene, USA	
Netzgerät	Consort	E455
Nitex-Gewebe		Polyester, 100 µm



Fortsetzung Tab. 3.1.9: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Objektmikrometer	Hund	Typ: 2 mm / 200 Skt
PCR-Cycler	Biometra	T3-Thermocycler
pH-Meter	WTW	MultiLine P4
Elektrode	WTW	SenTix 41
Photometer	Pharmacia Biotech	Ultraspec 3000
Quarzküvetten	Hellma	Suprasil 105.202-QS
Reverse Osmoseanlage für H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>		
Scanner zur Digitalisierung von Bildern	Hewlett-Packard	Scanjet 7400c
Schüttelplatten	IKA Labortechnik	KS 125 basic KS 260 basic KS 501
Schüttelschränke, klimatisiert	B. Braun B. Braun Infors Edmund Bühler	CERTOMAT H CERTOMAT BS-1 CH-4103 SM-30
Sequenzierer	Applied Biosystems, USA	ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Sterilbänke, Klasse 2	Nunc Heraeus	M50726 / 1 HERA safe HS12
Transilluminationstische: UV Blaulicht	Brunschwig Chemie Clare Chemic. Research	N-90M, 6 x 15W DR-45M
Trockenschrank	Memmert	-
Ultraschallgenerator	Bandelin	SONOPULS HD 70
Piezoelektr. Schwingungswandler		UW 70
Sonotrode		SH 70
Ultraschallwasserbad	Bandelin	SONOREX RK 100
Versuchsgefäße, 5 l	Buchsteiner	Eimer, M.MB, #3102
Waagen	Kern Sartorius Chyo	470 Basic BA4100S MP-3000
Wasserbäder	GFL	1002 1083
Zentrifugen		
Kühlzentrifugen	Heraeus Heraeus	Megafuge 2.0 R Multifuge 1 <sub>L-R</sub>
Tischzentrifugen	Heraeus Hettich	Biofuge pico Mikro 20

### 3.1.12 Verwendete Computersoftware und Datenbanken

Die für die Datenauswertung benutzte Software, sowie Datenbanken sind in Tabelle 3.1.10 genannt:

**Tab. 3.1.10:** Verwendete Computersoftware und Datenbanken.

Software	Anwendung	Referenz
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Nukleotidsequenzvergleich, Datenbankvergleich	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a> , Altschul et al. 1997
Excel	Diagramme, Regressionsanalysen	Microsoft. <a href="http://www.microsoft.com">http://www.microsoft.com</a>
Gel-Pro Express V4.0	Bilddokumentation Fluoreszenzmikroskop	Intas. <a href="http://www.intas.de">http://www.intas.de</a>
Image Quant V5.2	Bildbearbeitung Imager	Molecular Dynamics. <a href="http://www.mdyn.com">http://www.mdyn.com</a>
MultiAnalyst V1.1	Bilddokumentation von Gelen	BioRad. <a href="http://www.bio-rad.com">http://www.bio-rad.com</a>
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	<a href="http://www.ncbi.nih.gov/">http://www.ncbi.nih.gov/</a>
Photoshop 6, 7, CS	Bildbearbeitung	Adobe. <a href="http://www.adobe.com">http://www.adobe.com</a>
SPSS V11.5, 12.0, 13.0	Statistik	SPSS. <a href="http://www.spss.com">http://www.spss.com</a>
Typhoon Scanner Control V1.0	Imager-Steuerung	Molecular Dynamics <a href="http://www.mdyn.com">http://www.mdyn.com</a>
Zeiss LSM Image Browser V3,1,0,99	Bildbearbeitung CLSM	Zeiss. <a href="http://www.zeiss.de">http://www.zeiss.de</a>
MovieMaker V5.1	Videobearbeitung	Microsoft
DIVX V6.0	Videobearbeitung	<a href="http://www.divx.com">http://www.divx.com</a>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Präparation von Mikroorganismen

#### 3.2.1.1 Anzucht von Bakterienisolaten

Die marinen Bakterien  $\alpha$ -Proteobakterium SB89, *Vibrio* sp. SB177 und Mutanten, *Vibrio fischeri* ES114 und Mutanten, *Bacillus* sp. SB144 und *Pseudoalteromonas* sp. SB200 wurden auf Zobell-Agarmedium bei 25°C angezogen. Alternativ erfolgte die Anzucht in Zobell-Flüssigmedium. Für die Experimente wurden Zellen aus der exponentiellen bis zur frühen stationären Phase verwendet. Zum Anlegen von Kryokulturen wurde von den auf Nährmedien ausgestrichenen Bakterien jeweils eine Kolonie gepickt und eine 3 ml Flüssigkultur angeimpft. Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600} = \sim 0,8$  wurde 1 ml der Kultur entnommen, in ein steriles Kryoröhrchen pipettiert und bei  $\leq -80$  °C eingefroren. Die für molekularbiologische Arbeiten verwendete *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agarmedium oder LB-Flüssigmedium bei 37 °C angezogen. Für Kryokulturen von *E. coli* wurde die Bakteriensuspension mit 25 % Glycerin versetzt.

#### 3.2.1.2 Präparation von Schwammsymbionten

Zur Präparation von Schwammsymbionten wurden etwa 20 g Schwammgewebe mit sterilem Calcium- / Magnesium-freien Seewasser mit EDTA (CMFASW-E) wiederholt abgespült, um die Zahl anhaftender bakterieller Seewasserkontaminanten zu vermindern. Das Schwammgewebe wurde in einem Mörser in etwa 70 ml eisgekühltem CMFASW-E aufgenommen und mit einer Rasierklinge in möglichst dünne Scheiben geschnitten. Es erfolgte zweimalige Waschung mit gekühltem CMFASW-E, danach wurden die Gewebescheiben 30 min in frischem CMFASW-E bei 4°C inkubiert und nachfolgend mit dem Pistill zerkleinert. Das Homogenisat wurde durch Nitexgewebe mit 100  $\mu$ m Maschenweite gefiltert, um nicht-dissoziierte Gewebeanteile zu entfernen. Durch die anschließende Zentrifugation bei 400 g / 10 min wurden die Schwammzellen abgetrennt, der Überstand wurde dekantiert und bei 4.000 g / 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde zweimal mit CMFASW-E gewaschen und schließlich in 10 ml ASW aufgenommen. Zur Quantifizierung von Schwammsymbionten wurde mit einem Korkbohrer ( $\varnothing = 10$  mm) ein Gewebezylinder entnommen, der auf eine Masse von 1,0 g getrimmt wurde. Das Gewebestück, das an einer Seite Epipinacoderm aufwies, wurde dreimal mit sterilfiltriertem Seewasser (200 nm Porenweite) abgespült und in 9 ml CMFASW-E überführt. Es folgte eine

Gewebedissoziation wie oben beschrieben. Die bei der Filtration durch das Nitexgewebe zurückgebliebenen Gewebereste wurden weitere zwei Mal in 10 ml (Gesamtvolumen) CMFASW-E aufgenommen und wiederholt prozessiert, um eine vollständige Dissoziation zu erzielen. Die Suspensionen wurden mit Formaldehyd-Lsg. (3,7 % Endkonzentration) fixiert und bis zur Auszählung bei 4°C gelagert.

### **3.2.2 Bestimmung der Bakterienzahl**

#### **3.2.2.1 Bestimmung bei kultivierbaren Bakterien**

Die Bestimmung der „colony forming unit“ (CFU)-Anzahl erfolgte standardmäßig durch Ausplattierung von Verdünnungsreihen ( $10^0x - 10^{-7}x$ ) auf geeigneten Agarmedien durch die „glass-bead“-Methode. Nach 24 - 48 h Inkubation bei geeigneter Temperatur erfolgt die manuelle Auszählung der Kolonien (CFU's). Platten mit weniger als 10 Kolonien wurden aus statistischen Gründen nicht in die Zellzahlbestimmung einbezogen.

#### **3.2.2.2 Kultivierungsunabhängige Bestimmung**

Bei bislang nicht kultivierten Bakterien wurde die Zellzahl direkt durch mikroskopische Auszählung der angefärbten Zellen bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid) (Endkonzentration  $500 \text{ ng ml}^{-1}$ ) versetzt und für 60 - 120 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Die angefärbten Zellen wurden mittels einer Glasfilterapparatur auf fluoreszenzfreie Membranfilter aufgezogen. Dazu wurde auf die Glasfritte ein Nitrocellulose-Filter mit 450 nm Porenweite (Typ HABP) aufgelegt, der als Stützunterlage für den darüber aufgelegten Polycarbonat-Filter mit 200 nm Porenweite (Typ GTBP) diente. Mittels des Glaszylinders wurden beide Filter angepresst und mit 5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{d, 200 \text{ nm}}$  vorgespült. Die angefärbte Zellsuspension wurde aufgefildert (Unterdruck  $\leq 35 \text{ KPa}$ ) und mit mind. dem 10fachen Vol.  $\text{H}_2\text{O}_{d, 200 \text{ nm}}$  gewaschen, im letzten Waschschrift wurden 0,5 Vol. 50% EtOH hinzugeben, um DAPI-Reste vollständig zu entfernen. Der 200 nm Poren-Filter wurde abgehoben, auf einen Objektträger aufgebracht und mit  $\sim 30 \mu\text{l}$  Citifluor A2 eingedeckt. Alle Arbeitsschritte wurden bei gedämpftem Licht durchgeführt, um eine Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern.

Die Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop mit UV-Anregung und geeignetem Emissionslichtfilter. Um die Anzahl der Bakterienzellen pro Flächeneinheit zu

quantifizieren, wurde ein Zählgitter im Okular montiert und die Zellzahl für eine definierte Anzahl von Kleinfeldern bestimmt. Die Anzahl der gezählten Zellen lag in Übereinstimmung mit Kepner & Pratt (1994) bei mindestens 200. Eine zu niedrige oder wesentlich höhere Zellzahl wurde durch eine Veränderung des aufgefilterten Probenvolumens korrigiert. Pro Filter wurden zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt. Es wurde der Durchschnitt der zehn Auszählergebnisse für jeweils gleiche Kleinfeldzahlen gebildet und für die Auszählung der gesamten Zählgitterfläche (10 x 10 Kleinfeldern) korrigiert. Die Fläche unter dem Zählgitter wurde durch eine Kantenvermessung mittels eines Objektmikrometers bestimmt. Nach Ermittlung der gesamten Filterfläche konnte die Anzahl der auf dem Filter befindlichen Zellen (entsprechend der Zellzahl im aufgefilterten Volumen) errechnet, bzw. die Anzahl der Zellen  $\text{ml}^{-1}$  angegeben werden.

### 3.2.3 *In vivo* Filtrationsexperimente an Schwämmen

Durch Filtrationsexperimente wurden die Filtrationsraten von Schwämmen gegenüber Bakterienisolaten, Seewasserkonsortien und Schwammsymbiontenkonsortien bestimmt. In den Experimenten wurden intakte, metabolisch aktive Schwämme verwendet. Diese wurden mind. 2 Tage vor der experimentellen Durchführung gesammelt und in Becken gehältert, die von natürlichem Seewasser durchströmt wurden. Die experimentelle Durchführung erfolgte in 5 l Versuchsgefäßen, diese wurden mit 2 l autoklaviertem Seewasser gefüllt. Die Öffnung der Versuchsgefäße wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt, um Kontaminationen zu verhindern. Eine Aquariumpumpe generierte eine moderate Strömung, da dies die Pumpaktivität der Schwämme stimulierte. Die Temperatur des Inkubationswassers wurde der natürlichen Seewassertemperatur  $\pm 1^\circ\text{C}$  angepasst. In periodischen Abständen wurde bei abgeschalteter Aquariumpumpe die natürliche Pumpaktivität der Schwämme kontrolliert, dazu wurden mit einer Pipette etwa 5  $\mu\text{l}$  Fluorescein-Lsg. neben der Oscularöffnung abgesetzt, wodurch die vom Schwamm generierte Wasserströmung sichtbar wurde. Bei Start der Experimente wurden  $\sim 2 \times 10^9$  Bakterien in das Versuchsgefäß gegeben. Zur Untersuchung von Seewasserkonsortien wurde angereichertes Seewasser mit einer erhöhten Zellzahl verwendet. Diese methodische Modifikation war notwendig, um die am Versuchsende verminderte Zellzahl noch quantifizieren zu können, ohne das Probenvolumen auf über 10 ml zu erhöhen. Um angereichertes Seewasser zu erhalten, wurden 10 l natürliches Seewasser in einem Nalgene-Plastikgefäß mit 25 ml Zobell-Flüssigmedium versetzt und für 8 h unter aeroben

Bedingungen (Luftüberstand im Inkubationsgefäß) bei natürlicher Seewassertemperatur inkubiert. Durch die Zugabe geringer Nährstoffmengen erfolgte unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Zellzahl um etwa 1 log-Stufe. Vor den Filtrationsexperimenten wurde das angereicherte Seewasser im Verhältnis 1 : 1 mit frischem Seewasser verdünnt.

Über 300 min Gesamtversuchsdauer wurden Wasserproben in Zeitintervallen entnommen und die Bakterienkonzentrationen bestimmt. Für kultivierbare Bakterien erfolgte die Ausplattierung unmittelbar nach Probennahme. Bei den bislang nicht kultivierbaren bakteriellen Konsortien wurde ein Probenvolumen von 10 ml entnommen, durch Zugabe von Formaldehyd-Lsg. (3,7% Endkonzentration) fixiert und bis zur mikroskopischen Zellzahlbestimmung bei 4°C gelagert. Um eine Veränderung der phylogenetischen Zusammensetzung von bakteriellen Konsortien durch Schwammfiltration zu untersuchen, wurde ein Filtrationsexperiment mit 3 l Inkubationsvolumen durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 0, 100, 200 und 300 min wurde jeweils eine Probe von 250 ml entnommen und mit Hilfe einer Filtrationsapparatur auf Polycarbonat-Membranfilter (Ø: 47 mm, Typ PC MB 47MM 0.2UM) aufgezogen. Die Filter wurden in sterilen Kryoröhrchen verpackt und bis zur weiteren Prozessierung bei  $\leq -80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Parallel wurden 10 ml Proben zur Zellzahlbestimmung mittels DAPI-Färbung entnommen.

### 3.2.3.1 Bestimmung der Filtrationsraten

Die Filtrationsrate  $r$  ist definiert als die Anzahl der vom Schwamm aufgenommenen Bakterien, normalisiert für die Zeit und die Schwammmasse. Zur Berechnung der Filtrationsrate wurden die ermittelten Bakterienkonzentrationen des Inkubationswassers in einem Diagramm logarithmisch über die Zeit aufgetragen. Es wurde ein 100 min Zeitintervall ausgewählt, das eine möglichst gleichförmig lineare (negative) Steigung aufwies. Für dieses Intervall wurde eine Regressionsgerade errechnet, die ermittelte Steigung ( $y_S$ ) wurde durch Subtraktion mit der Steigung der Kontrolle ( $y_K$ ) korrigiert.

$$y = y_S - y_K$$

Die korrigierte Steigung  $y$  beschreibt die logarithmische Abnahme der Zellzahl pro Zeiteinheit (min), bedingt durch die Filtrationsaktivität des Schwamms. Die Filtrationsrate  $r$  wurde durch folgende Formel errechnet:

$$r = \frac{1 - \left(10^{(y \cdot 60)}\right)}{g \text{ Schwamm (Nassmasse)}} C_0 V$$

$r$ : Anzahl der filtrierten Bakterienzellen  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse)  $h^{-1}$

Dabei ist  $y$  die korrigierte Steigung der Regressionsgeraden für das 100 min Zeitintervall, 60 der Multiplikationsfaktor für 1 h,  $C_0$  die initiale Bakterienkonzentration und  $V$  das Inkubationsvolumen (ml) des Versuchsgefäßes. Die initiale Bakterienkonzentration wurde mit  $C_0 = 1,00 \times 10^5$  Zellen  $ml^{-1}$  vorgegeben. Dadurch wurde für variierende Bakterienzahlen während der experimentellen Durchführung und unterschiedliche Zeitpunkte des exponentiellen Filtrationsbeginns kompensiert und somit standardisierte Ergebnisse erhalten.

### 3.2.3.2 Normalisierung der Filtrationsraten

Bei den Filtrationsexperimenten wurde eine starke Allometrie für die bakterielle Filtration festgestellt. Mit Allometrie werden allgemein Unproportionalitäten zwischen einer Bezugsgröße, z.B. der Körpermasse, und physiologischen Leistungen eines Organismus beschrieben. Bei *A. aerophoba* blieb z. B. die Anzahl der aufgenommenen Bakterien Schwamm $^{-1}$  über variierende Massen fast konstant. Da die Filtrationsraten  $r$  als Quotienten zur Schwammmasse berechnet wurden, zeigten diese eine starke Abhängigkeit von der Schwammmasse. Um eine vollständige Normalisierung, mit einer Unabhängigkeit von der Schwammmasse, zu erzielen, mussten die Filtrationsraten  $r$  für die vorliegende Allometrie korrigiert werden. Für die Korrektur wurde eine Schwammmasse von 75 g (Nassmasse) als „Prototyp“-Schwammmasse definiert. Mit Hilfe der Allometriegleichungen aus Kapitel 4.3 wurden die Filtrationsraten  $r$  für die unterschiedlichen Schwamm Massen korrigiert. Die erhaltenen normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  geben die Anzahl der aufgenommenen Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse, normalisiert auf eine „Prototyp“-Schwammmasse von 75 g)  $h^{-1}$  an. Die normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  wurden auch für die Schwammtrockenmasse normalisiert, es wurden normalisierte Filtrationsraten  $r_{nt}$  erhalten. Diese geben die Anzahl der aufgenommenen Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm (Trockenmasse, äquivalent zu einer Nassmasse von 75 g)  $h^{-1}$  an. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen Nass- und Trockenmasse wurden die Nassmassen der Schwämme nach den Experimenten bestimmt. Die Schwämme wurden vorsichtig aus den Versuchsgefäßen entnommen und gewogen. Alternativ wurde die

Volumenverdrängung von Seewasser im Messzylinder gemessen. Zur Trocknung wurden die Schwämme zunächst für ~2 d im Abzug bei RT vorgetrocknet, anschließend für 2 h bei 160°C im Trockenschrank getrocknet und gewogen.

### 3.2.4 Isolation von DNA

#### 3.2.4.1 DNA-Extraktion aus bakteriellen Konsortien

Die Membranfilter mit den aufgefilterten Bakterienzellen wurden geviertelt und jeweils ein Viertel für die DNA-Extraktion durch alkalische Lyse verwendet. Das Filterstück wurde in einem Reaktionsgefäß (RG) mit 265 µl Lysepuffer A und 535 µl Lysepuffer B versetzt und für 45 min gevortext. Um ein quantitatives Aufbrechen der Zellwände und eine Ablösung der DNA von der Zellwand zu erreichen, wurde der Lyseansatz mit Ultraschall behandelt. Die sterilisierte Spitze der Sonotrode wurde in die Lösung getaucht und 20 Pulse (Einstellungen: Cycle: 60%, Leistung: Raste MS 72/D) appliziert. Danach noch auf der Membranfläche anhaftende Zellfragmente wurden durch eine sterile Pipettenspitze abgestreift. Der Filter wurde aus dem RG entfernt und 400 µl 3 M Natriumacetat-Lsg. (pH = 4,8) hinzupipettiert, es wurde für 5 min gevortext, danach das Proteinpräzipitat durch Zentrifugation (5 min / 10.000 g) abgetrennt.

Um Verunreinigungen wie Proteine, Kohlenhydrate und aromatische Verbindungen quantitativ zu entfernen, wurde die DNA einer Reinigung mit CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) und anschließender Phenolextraktion unterzogen (Ausubel et al. 2003). Dazu wurden zu den 1200 µl Überstand 200 µl 5 M NaCl und 160 µl CTAB-Extraktionslösung (diese auf 60°C vorgewärmt) hinzupipettiert, unter gelegentlichem Umschwenken wurde für 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 750 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24 / 1) hinzugegeben, 1 min gevortext und 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde unter großzügiger Zurücklassung der Phasengrenze in ein neues RG überführt. Es wurden 750 µl Phenol (equilibriert, stabilisiert, pH = 7,8) / Chloroform / Isoamylalkohol ( 24 / 24 / 1) hinzugegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand in ein frisches RG transferiert. Zur Entfernung von Phenolresten wurde mit 750 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24 / 1) gewaschen. Der Überstand wurde in ein neues RG pipettiert, das erhaltene Volumen gemessen und die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol (~20 min / -20°C) gefällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (10.000 g / 10 min), der Überstand vollständig entfernt, die DNA unter sterilen Bedingungen getrocknet und schließlich in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>



gelöst. Unter Berücksichtigung der Volumenverluste während der Aufreinigung wurde die DNA-Konzentration so eingestellt, dass 1 µl Lsg. 1 ml der aufgefilderten Bakteriensuspension entsprachen. Die Methode der DNA-Reinigung durch CTAB-Extraktion übertrifft qualitativ zahlreiche kommerzielle Kits (z.B. Qiagen Soil Kit). Die Effizienz und Sensitivität der Methode liegt bei weniger als sechs nachweisbaren Genomäquivalenten (Nachweis über PCR mit 27f / 1385r-Primer).

#### 3.2.4.2 Plasmid-Mini-Präparation

Zur Plasmid-Isolation durch alkalische Lyse wurden die Bakterienzellen einer 1,5 ml ÜN-Kultur abzentrifugiert (4.000 g / 5 min). Die Zellen wurden in 100 µl Lysepuffer A resuspendiert, der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert, es wurden 200 µl Lysepuffer B hinzugegeben, durch vorsichtiges Umschwenken wurde gemischt, anschließend 150 µl 3 M Natriumacetat-Lsg (pH = 4,8) hinzupipettiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zellfragmente und denaturierte Proteine wurden abzentrifugiert (4.000 g / 5 min) und der klare Überstand in ein neues RG pipettiert. Bei wildtypischen Bakterienisolaten mussten vorhandene Nukleasen durch eine nachfolgende Phenolreinigung entfernt werden. Dazu wurde 1 Vol. Phenol (equilibriert, stabilisiert, pH = 7,8) / Chloroform / Isoamylalkohol ( 24 / 24 / 1) hinzupipettiert. Es wurde kurz gevortext, 1 min bei 10.000 g zentrifugiert und danach die obere, wässrige Phase in ein neues RG überführt. Die DNA wurde mit 1 Vol. Chloroform / Isoamylalkohol (24 / 1) gewaschen und die wässrige Phase in ein neues RG transferiert. Durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und Inkubation für 20 min bei -20°C wurde die Plasmid-DNA gefällt, es folgte Zentrifugation (10.000 g / 10 min), der Überstand wurde abgezogen, die DNA getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst. Durch Zugabe von 1 µl RNase-Lsg. (10 mg ml<sup>-1</sup>) und Inkubation für 10 min bei 50 °C wurde RNA entfernt.

#### 3.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von wässrigen DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei λ = 260 nm und λ = 280 nm bestimmt. Dazu wurde 1 µl der DNA-Lsg. in 999 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt und am Photometer vermessen, die Kalibration erfolgte gegen eine Quarzküvette mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Für einen Lichtweg von 10 mm gelten folgende Korrelationen:

$$A_{260 \text{ nm}} = 1 \quad \sim 50 \mu\text{g dsDNA ml}^{-1}$$

$$A_{260 \text{ nm}} = 1 \quad \sim 40 \mu\text{g RNA ml}^{-1}$$

Dabei sollte  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} = 1,5 - 2,0$  betragen, für RNA-freie, saubere DNA wird ein Quotient von  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} = 1,8$  erhalten.

### 3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Amplifikation von DNA, z.B. 16S rDNA verwendet. Als „template“ (engl., etwa: Matrizen-DNA) wurden aufgereinigte DNA oder intakte Bakterienzellen (Kolonie-PCR) verwendet. Für eine Kolonie-PCR mariner Bakterien wurde eine kleine Kolonie ( $\varnothing \sim 0,5$  mm) in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  resuspendiert und 5 min bei 100°C aufgeköcht. Danach wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (2 min / 10.000 g) und 3  $\mu\text{l}$  der Lsg. als „template“ in einem 50  $\mu\text{l}$  Standard-Reaktionsansatz eingesetzt.

Standard-Reaktionsansatz:

Taq-Polymerase-Puffer, 10x	5 $\mu\text{l}$
Q-Solution, 5x	10 $\mu\text{l}$
Taq-Polymerase (5 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,20 $\mu\text{l}$
Primer vorwärts (100 $\mu\text{M}$ )	0,25 $\mu\text{l}$
Primer rückwärts (100 $\mu\text{M}$ )	0,25 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	33 $\mu\text{l}$
„template“-DNA	1 $\mu\text{l}$

Standard-Protokoll für PCR:

1. Primäre Denaturierung	95 °C	300 s
2. Zyklische Denaturierung	95 °C	60 s
3. „annealing“ der Primer	$T_{\text{AN}}$	60 s
4. Elongation	72 °C	$S_{\text{ELO}}$
5. Abschließende Elongation	72 °C	120 s

Die Schritte 2 – 4 wurden, je nach benötigter DNA-Menge, 30x – 35x wiederholt.

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer berechnet sich aus der Länge und dem GC-Gehalt des Oligonukleotids nach folgender Formel:

$$T_m = 69,3 + 0,4 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650 (\text{Länge des Primers in nt})^{-1}$$

Gewöhnlicherweise wurde eine Annealingtemperatur ( $T_{AN.}$ ) verwendet, die etwa 2 – 3°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer lag. Die Spezifität der PCR-Reaktion wurde durch Bestimmung der Produktlänge mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Die Elongationszeit ( $s_{ELO.}$ ) richtete sich nach der Länge der Syntheseprodukte und der spezifischen Extensionsrate der Polymerase, die für die verwendete Taq-DNA-Polymerase von Qiagen (Produkt-Nr.: 201203) 2 (- 4) Kb  $\text{min}^{-1}$  beträgt. Für die Durchführung einer Standard-PCR mit guter Produktausbeute wurde jedoch eine Extensionsrate von 1 Kb  $\text{min}^{-1}$  zu Grunde gelegt. Verwendete PCR-Parameter gibt Tab. 3.2.1 an.

**Tab. 3.2.1:** Verwendete Annealingtemperaturen und Elongationszeiten für gängige Primerkombinationen

Primer-Paar	$T_{AN.}$	$s_{ELO.}^*$	Länge (bp)
27f / 1385r	50,5°C	90 s / 290 s*	1385
341f(GC) / 907r	52,5°C	40 s / 120 s*	586
341f(GC) / 517r	52,5°C	15s / 40 s*	194
T7 / SP6	45,0°C	div.	div.

$s_{ELO.}^*$ : Bei der Amplifikation von Fragmenten, die mittels einer DGGE-Analyse untersucht oder sequenziert wurden, wurde die Elongationszeit auf den ~7fachen Wert (3,5 min  $\text{Kb}^{-1}$ ) angehoben. Die abschließende Elongationszeit wurde auf 5 min erhöht, da eine Verlängerung dieser Zeiten für eine Abnahme von PCR-Artefakten verantwortlich ist (Qiu et al. 2001, Janse et al. 2004).

### 3.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA nach der Sanger-Methode wurde am automatisierten Kapillarelektrophorese-Sequenzierer (ABI PRISM 310) unter Nutzung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTP's) vorgenommen. Das Laser-basierte Detektionssystem vermaß den Typ des terminalen, fluoreszenzgekoppelten ddNTP's in Korrelation zur Fragmentlänge (Retentionszeit). Für die spezielle Sequenzier-Reaktion und die nachfolgende Aufreinigung wurden die Chemikalien und das Protokoll des Herstellers verwendet (Applied Biosystems, USA). Nicht automatisch erkannte Nukleotidpositionen in der ermittelten Sequenz wurden durch Analyse des Elektrogramms manuell korrigiert.

### 3.2.7 Endonuklease-Verdau von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA erfolgte durch Endonukleasen. Der enzymatische Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 100 µl mit ~5 µg DNA, 1x Konzentration des empfohlenen Puffers und 1 - 2 U des Restriktionsenzym. Die Reaktionszeit und Dauer richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers, spezielle Enzymeigenschaften, wie z. B. Star-Aktivitäten und Methylierungsinhibitionen, wurden beachtet. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Enzym durch Aufkochen oder durch Phenol / Chloroform-Extraktion inaktiviert. Für RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismus)- Analysen wurden 10 - 20 µl des Restriktionsansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das DNA-Bandenmuster analysiert. Die in dieser Arbeit ermittelten RFLP-Muster sind im Anhang B1 zusammengefasst.

### 3.2.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von PCR-Fragmenten wurde das pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I-Kit (Promega) verwendet. Der bereits linearisierte Vektor pGEM-T besitzt überhängende Thymidin-Enden. PCR-Produkte mit überhängenden Adenosin-Resten (Taq-Polymerase) werden durch T4-Ligase effizient in den Vektor ligiert (AT-Klonierung). Die Klonierungsstelle liegt innerhalb des lacZ-Gens, das als Selektionsmarker für „inserts“ (engl., integrierte DNA) dient. Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion auf transformierte Zellen. Ligationsansatz und Inkubationsdauer folgten den Angaben des Herstellers. Ein halber Ligationsansatz (5 µl) wurde für die Klonierung in *E.coli* DH5α durch Hitze-Schock verwendet. Es erfolgte Ausplattierung auf AIX-Platten und Selektion von transformierten und „insert“-tragenden Kolonien.

### 3.2.9 Elektrophoretische Methoden

#### 3.2.9.1 Agarose-Gele

Die massenspezifische Auftrennung von DNA erfolgte für Routineanwendungen durch Agarose-Gele. Je nach Fragmentlänge wurden Gele mit 0,7% - 4% Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Zum Auftragen der DNA wurde Agarose-Laufpuffer hinzugegeben. Die

Elektrophorese erfolgte bei  $7 \text{ V cm}^{-1}$ , je nach Gel- und Fragmentgröße für 20 - 60 min. Nach Ende der Elektrophorese wurde die DNA durch Inkubation des Gels für 10 – 15 min in Ethidiumbromid-Lsg. ( $500 \text{ ng ml}^{-1}$ ) angefärbt, das Gel wurde kurz in  $\text{H}_2\text{O}_d$  gewaschen und unter UV-Anregungslicht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) ausgewertet.

### **3.2.9.2 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)**

Bei der DGGE werden gleichlange Fragmente in Abhängigkeit ihres spezifischen Schmelzverhaltens, entsprechend dem GC-Gehalt, aufgetrennt. Für die DGGE von 16S rDNA Fragmenten aus komplexen mikrobiellen Konsortien erfolgte zunächst die Amplifikation der Fragmente über PCR unter Verwendung der speziellen DGGE-Primer mit „GC-clamp“. Die PCR-Produkte wurden auf Agarose-Minigelen auf ihre spezifische Größe kontrolliert. Zur Durchführung der DGGE wurde das DCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System (BioRad) verwendet. Die Gele hatten eine Größe von 160 x 165 mm (Breite / Höhe), mit einer effektiven Laufstrecke von 140 mm, die Gelstärke betrug 0,75 mm. Für DNA-Fragmente mit einer Länge von  $\sim 200 \text{ nt}$  wurden 10% Acrylamid-Lösungen verwendet. Es wurden jeweils 12,5 ml hochdenaturierende Acrylamid-Lsg. (z. B.: 100%) und gering / nicht denaturierende Lsg. (z. B.: 0%) vorgelegt, jeweils 40  $\mu\text{l}$  10% APS-Lsg. und 16  $\mu\text{l}$  TEMED hinzugeben und gemischt. Jeweils 11 ml der entgasten Lösungen wurden in Spritzen aufgezogen und mittels des Gradienten-Mixers ein Gel mit einem kontinuierlichen Gradienten gegossen, der hochdenaturierende Anteil lag im unteren Gelbereich. Zur Polymerisation wurde das Gel für 2 h bei RT inkubiert, danach in Frischhaltefolie eingeschlagen und für weitere 10 h bei  $10^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Inkubation diente der homogenen Ausbildung des denaturierenden Gradienten. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit DGGE-Laufpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei  $60,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , bei einer Spannung von 150 V und einer Elektrophoresedauer von 6 h. Anschließend wurde das Gel aus dem Tank entnommen, eine Glasscheibe entfernt und die DNA mit SYBR-Farbstoff angefärbt.

### **3.2.10 DNA-Nachweis und Prozessierung von DGGE-Banden**

Zur sensitiven Anfärbung von DNA wurde das Gel für 45 min in der SYBR-Färbelösung (1x Konzentration in 1x TAE) in Dunkelheit auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Das Gel wurde anschließend 20 s unter  $\text{H}_2\text{O}_d$  gespült und auf eine transparente Folie (z. B.: Overhead-Folie) transferiert und die Oberseite mit Frischhaltefolie eingedeckt. Die Auswertung des Gels

erfolgte am Laser-Scanner Typhoon 8600, als Excitationsquelle diente ein Nd:YAG-Laser ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ). Da das Emissions-Maximum der SYBR-Farbstoffe zwischen  $\lambda_{\text{max}} = 520 - 537 \text{ nm}$  liegt, wurde ein Hochpassfilter (526SP) benutzt. Die Detektion der Emissionsstrahlung erfolgte an hochsensitiven Photomultiplier-Röhren mit einer maximalen Pixelauflösung von  $100 \mu\text{m}$ . Nach der Bilddokumentation erfolgte ggf. das Ausschneiden von Banden. Dazu wurde das Gel auf einem Transilluminationstisch mit blauem Anregungslicht ( $\lambda = \sim 480 \text{ nm}$ ) platziert, mit einem sterilen Skalpell wurden relevante Banden ausgeschnitten und in RG's überführt. Zum Lösen der DNA wurde das Gelfragment für 12 h bei  $7^\circ\text{C}$  in  $20 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  inkubiert. Die gelöste DNA wurde direkt sequenziert, dazu wurden  $\sim 5 \mu\text{l}$  der DNA-Lsg. als „template“ für die Sequenzier-PCR eingesetzt. Alternativ wurde die DNA zunächst mit Primer ohne GC-clamp amplifiziert und anschließend kloniert (z. B. in den Vektor pGEM-T Easy).

### 3.2.11 Genetische Veränderung von Bakterien

#### 3.2.11.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für allgemeine Klonierungsarbeiten wurden *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen verwendet. Zur Anzucht wurde eine 100 ml Kultur auf dem Schüttler bei  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,7$  angezogen. Die Zellen wurden in der Kühlzentrifuge ( $4.000 \text{ g} / 10 \text{ min} / 4^\circ\text{C}$ ) abzentrifugiert und zweimal mit 30 ml eiskalter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lsg gewaschen, danach in 10 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lsg. aufgenommen und für 45 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 2 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lsg resuspendiert, 660  $\mu\text{l}$  Glycerin hinzupipettiert und Aliquots von 100  $\mu\text{l}$  ( $\cong 1 - 2 \times 10^9$  Zellen) angelegt, die bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert wurden.

#### 3.2.11.2 Transformation von Bakterien durch Hitze-Schock

Eine 100  $\mu\text{l}$  Kryokultur kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde hinzupipettiert und der Ansatz für 30 min auf Eis gelagert. Der Hitzeschock erfolgte durch Inkubation für 90 s bei  $42^\circ\text{C}$ , die Zellen wurden danach weitere 5 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt und schließlich auf Selektionsagarmedium ausplattiert.

### 3.2.11.3 Konjugation mariner Isolate

Für die Erzeugung transgener mariner *Vibrio*-Stämme mittels mobilisierbarer Plasmide wurden zwei aufeinanderfolgende Konjugationen durchgeführt. Dabei wurde eine Anreicherung der intermediären Mutanten vorgenommen, um die Effizienz zu erhöhen. Als Akzeptor diente eine Streptomycin-resistente ( $\text{Str}^{\text{R}}$ ) Mutante des Wildtyps (wt) *Vibrio* sp. SB177. Die Wahrscheinlichkeit für eine spontane Streptomycinresistenz liegt für *Vibrio* sp. in der Größenordnung  $\sim 10^{-6}$ . Zur Isolation einer Spontanmutante wurden etwa  $1 \times 10^9$  *Vibrio* sp. SB177 (wt)-Zellen auf Zobell-Agarmedium + Streptomycin ausgestrichen. Nach drei Tagen wurden Kolonien gepickt und drei weitere Male wiederholt auf Selektionsmedium überimpft. Der Klon mit der größten Koloniegröße wurde für die weiteren Arbeiten verwendet.

Zur Konjugation wurde der Donor-Stamm *Vibrio fischeri* ES114 (pKV111;  $\text{Cm}^{\text{R}}$ ; rsGFP) zusammen mit dem Plasmid-mobilisierenden Helferstamm *E. coli* MM294 (pRK2013;  $\text{Km}^{\text{R}}$ ) auf Zobell-Agarmedium ausgestrichen. Nach 48 h Inkubation bei  $25^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen mit 2 ml 1x PBS abgespült, einmal in PBS gewaschen, und eine 5 ml ÜN-Schüttelkultur in LB-Medium + Chloramphenicol (Cm) + Kanamycin (Km) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Mit diesem Schritt wurde auf *E. coli* MM294-Zellen selektioniert, die das Plasmid pKV111 aufgenommen hatten. Die Zellen der ÜN-Kultur wurden abzentrifugiert und zusammen mit einer vergleichbaren Anzahl von *Vibrio* sp. SB177 ( $\text{Str}^{\text{R}}$ )-Zellen auf Zobell-Agarmedium ausplattiert und bei  $25^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml ASW abgespült. Es wurde eine ÜN-Schüttelkultur in Zobell-Medium + Str + Cm bei  $25^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und auf Zobell-Agarmedium + Str + Cm ausplattiert. Nach 24 h Inkubation wurden Kolonien mit der Morphologie von *Vibrio* sp. SB177 gepickt. Um Reinkulturen zu erhalten, wurde dreimalig überimpft. Die Klone wurden auf Zobell-Agarmedium + Cm + X-Gal überimpft und 48 h inkubiert. Galactosidase exprimierende Klone wurden erneut überimpft und einer RFLP-Analyse unterzogen. Bei für *Vibrio* sp. SB177 typischem Restriktionsmuster (s. Anhang B1) wurde die 16S rDNA der Zellen sequenziert und ausgewertet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Der konstruierte Stamm wurde als *Vibrio* sp. MMW1 (pKV111; rsGFP;  $\text{Cm}^{\text{R}}$ ) bezeichnet. Durch mind. 10-malige Überimpfung und fluoreszenzmikroskopische Kontrolle wurde sichergestellt, dass der Stamm rsGFP stabil exprimierte und für mikroskopische Studien geeignet war.

### 3.2.12 Proteasebehandlung von Bakterienzellen

Um Proteine der bakteriellen Zellwand zu entfernen, wurden die Zellen mit Proteasen behandelt. Für Seewasserisolate musste der Verdau naturgemäß in ASW stattfinden. Die Zellen einer 5 ml ÜN-Kultur wurden abzentrifugiert (4.000 g / 5 min) und das Bakterienpellet in der Proteaselösung vorsichtig resuspendiert. Für den Verdau mit Papain-Lsg. wurde die Konzentration auf 500 µg Papain + 5 mg Cystein ml<sup>-1</sup> ASW eingestellt. Bei der Verwendung von Proteinase K wurde eine Konzentration von 100 µg ml<sup>-1</sup> ASW verwendet. Die Zellen wurden für 1 h bei 18°C inkubiert, anschließend zweimal mit ASW gewaschen und schließlich in 5 ml ASW aufgenommen. In Kontrollexperimenten wurde die Überlebensrate der proteasebehandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen überprüft, sie lag bei >96 %. Um eine erneute Proteinsynthese zu unterbinden, wurde versucht, die Zellen mit sublethalen Antibiotikakonzentrationen zu arretieren. Bei Inkubation mit 10 µg ml<sup>-1</sup> Chloramphenicol oder 75 µg ml<sup>-1</sup> Streptomycin lag der Anteil der nach 5 h noch teilungsfähigen *Vibrio* sp. SB177-Zellen bei >80%.

### 3.2.13 Fluoreszenzanfärbung von Bakterien

Die Zellen einer 5 ml ÜN-Schüttelkultur wurden bei  $\leq 4.000$  g / 5 min abzentrifugiert, das Zellpellet hatte ein Volumen von etwa 80 – 100 µl ( $\sim 1 \times 10^{10}$  Zellen). Marine Bakterien wurden in 2 ml ASW resuspendiert und mit 8 µl 5(6)-TAMRA/SE-Stocklsg. (1 mg ml<sup>-1</sup> DMSO) oder alternativ mit 5(6)-FAM/SE-Stocklsg. (2 mg ml<sup>-1</sup> DMSO) versetzt. Die stark fluoreszierenden Fluorochrome binden über eine reaktive Succinimidylester-Funktion an Amino-Gruppen zellulärer Proteine. Die gebundenen Farbstoffe haben keinen negativen Einfluss auf die Vitalität und die Adhärenzeigenschaften der Zellen (Fuller et al. 2000). Die Zellen wurden für 90 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit ASW entfernt.

### 3.2.14 Visualisierung aufgenommener Partikel in Schwammgewebe

Um die Aufnahme von Partikeln im Schwammgewebe mikroskopisch zu verfolgen, wurde ein Filtrationsexperiment wie in 3.2.3 durchgeführt. Zu den 2 l sterilen Seewasser wurden hier



jedoch fluoreszierende Latex Beads, TAMRA- / FAM-gefärbte Bakterienzellen oder GFP-exprimierende *Vibrio* sp. MMW1 gegeben. Die Partikelzahl des Inkubationswassers wurde auf etwa  $1 - 7 \times 10^6$  Partikel  $\text{ml}^{-1}$  eingestellt. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 300 min und 24 h wurde jeweils ein Schlot eines Schwammindividuums mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Nach der Probenentnahme wurde kontrolliert, dass die verbleibenden Schlote weiterhin Pumpaktivität zeigten. Das entnommene Schwammgewebe wurde in Aluminiumfolie eingeschlagen und bis zur weiteren Prozessierung in  $\text{N}_2$  eingefroren.

### 3.2.15 Anfertigung von Kryoschnitten

In  $\text{N}_2$  schockgefrorenes und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagertes Schwammgewebe wurde im Kryomikrotom auf  $\sim -26^\circ\text{C}$  erwärmt. Es wurde eine kleine Gewebeprobe entnommen und mit „Tissue-Tek“-Einbettmittel auf einem Präparatehalter aufgeklebt. An einem Stahlmesser wurden Kryoschnitte von etwa  $3 \mu\text{m}$  Schichtdicke angefertigt. Die noch gefrorenen Gewebeschnitte wurden auf einem nicht gekühlten Objektträger aufgenommen und bei RT in Dunkelheit getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger im Gefrierschrank bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Bei Proben mit instabilen Fluorochromen, wie z. B. GFP, wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen, der mit einem Citifluor A2-Film dünn überzogen war (gefroren in nass) und sofort am Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 3.2.16 Confokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Um die Lokalisation von Latex Beads im Schwammgewebe zu untersuchen, wurde das Actingerüst der Schwammzellen angefärbt. Dazu wurden Kryoschnitte des Gewebes für 2 min in 2,5% Glutaraldehyd / ASW fixiert und anschließend für  $3 \times 15$  min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gewaschen. Die Schnitte wurden 20 min mit 1% BSA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  vorinkubiert, anschließend wurde jeder Schnitt mit  $40 \mu\text{l}$  Phalloidin-Lsg ( $7,5 \mu\text{l}$  Phalloidin-Stocklsg.  $\text{ml}^{-1}$  in 1% BSA) überschichtet und bei RT für 60 min in Dunkelheit inkubiert. Ungebundenes Phalloidin wurde durch Waschung für  $3 \times 30$  min mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  entfernt. Die Schnitte wurden mit Citifluor A2 eingedeckt und am CLSM mikroskopiert. Laserquellen und Filtersets wurden so gewählt, dass alle Kanäle entkoppelt waren, es wurde ein „pin-hole“-Durchmesser gewählt, der für alle Kanäle eine optische Schichtdicke von  $\leq 600$  nm ergab.

### 3.2.17 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Fixierung von Schwammgewebe für die Elektronenmikroskopie wurden von Gewebestücken kleine Stücke mit einer Kantenlänge <1 mm mittels einer scharfen Rasierklinge entnommen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden in PCR-RG's mit 0,5 ml Volumen durchgeführt. Das Gewebe wurde durch mind. 48 h Inkubation in 2,5% Glutaraldehyd / ASW bei RT primär fixiert. Bei sehr kompaktem oder lipidhaltigem Schwammgewebe erfolgte die Fixierung durch 50 mM Cacodylat / 2,5% Glutaraldehyd / ASW. Das primäre Fixans wurde durch Waschung für 2 x 30 min in ASW entfernt, das Gewebestück danach für 48 h in 0,7% OsO<sub>4</sub> in ASW bei RT sekundär fixiert. Es folgte Waschung des Gewebes für 2 x 30 min in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Gewebeproben mit hohem Skleritanteil (z. B. *Tethya* sp.) wurden zur Demineralisierung für 2 h in 4% Flusssäure inkubiert und nachfolgend 2 x 30 min in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Die Gewebeproben wurden durch eine aufsteigende EtOH-Reihe entwässert. Dazu wurde das Gewebe jeweils für 1 h in 50%, 70%, 80%, 90% und 4x in 100% EtOH (p.a.) inkubiert und anschließend in Propylenoxid überführt. Es wurde 3 x 1 h in Propylenoxid inkubiert, danach wurde das Gewebe in 100 µl 1 / 1 (v / v) Propylenoxid / Glycidether 100 überführt und ÜN / RT bei geöffnetem Deckel des Inkubationsgefäßes inkubiert. Der nach Verdampfen des Propylenoxids über der Probe verbliebene Glycidether wurde entfernt und gegen neuen ausgewechselt, es folgte eine Inkubation für 4 h bei RT. Um einen möglichst guten Austausch des in das Gewebe eingezogenen Glycidethers zu erreichen, wurde das Gewebestück mehrmals vorsichtig durch den frischen Glycidether bewegt. Anschließend wurde der Glycidether nochmals gegen neuen ausgetauscht, das Gewebestück am Boden des RG's platziert, die Probe durch Einbettung eines Papierstreifens mit Registriernummer gekennzeichnet und schließlich für 3 d bei 60°C polymerisiert.

Zum Anfertigen von Ultradünnschnitten wurde die eingebettete Probe zunächst mit einer Rasierklinge pyramidenförmig getrimmt, danach wurden Semidünnschnitte am Ultramikrotom mit Glasmessern angefertigt, die im Lichtmikroskop kontrolliert wurden. Das Schneiden von Ultradünnschnitten erfolgte am Ultramikrotom unter automatischem Vortrieb an einer Diamantklinge. Die im Trog aufschwimmenden Schnitte wurden durch CHCl<sub>3</sub>-Dampf geglättet und schließlich mit einer Drahtschlinge auf die mit Parlodionfolie beschichteten Kupfernetzchen transferiert. Nach Antrocknung der Schnitte erfolgte die Kontrastierung durch 15 min Inkubation mit 2% Uranylacetat in EtOH, ungebundenes Salz wurde durch Waschung in einer absteigenden EtOH-Reihe mit 100%, 50% EtOH und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>,

---

$200\text{ nm}$  entfernt. Es folgt eine sekundäre Kontrastierung durch 10 min Inkubation in 50% Reynold's Bleicitrat-Lsg. in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}, 200\text{ nm}}$  unter  $\text{CO}_2$ -freier Atmosphäre. Das Netzchen wurde abschließend zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}, 200\text{ nm}}$  gespült und getrocknet. Die Mikroskopie erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 KV.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung der Bakterienhaltigkeit

#### 4.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

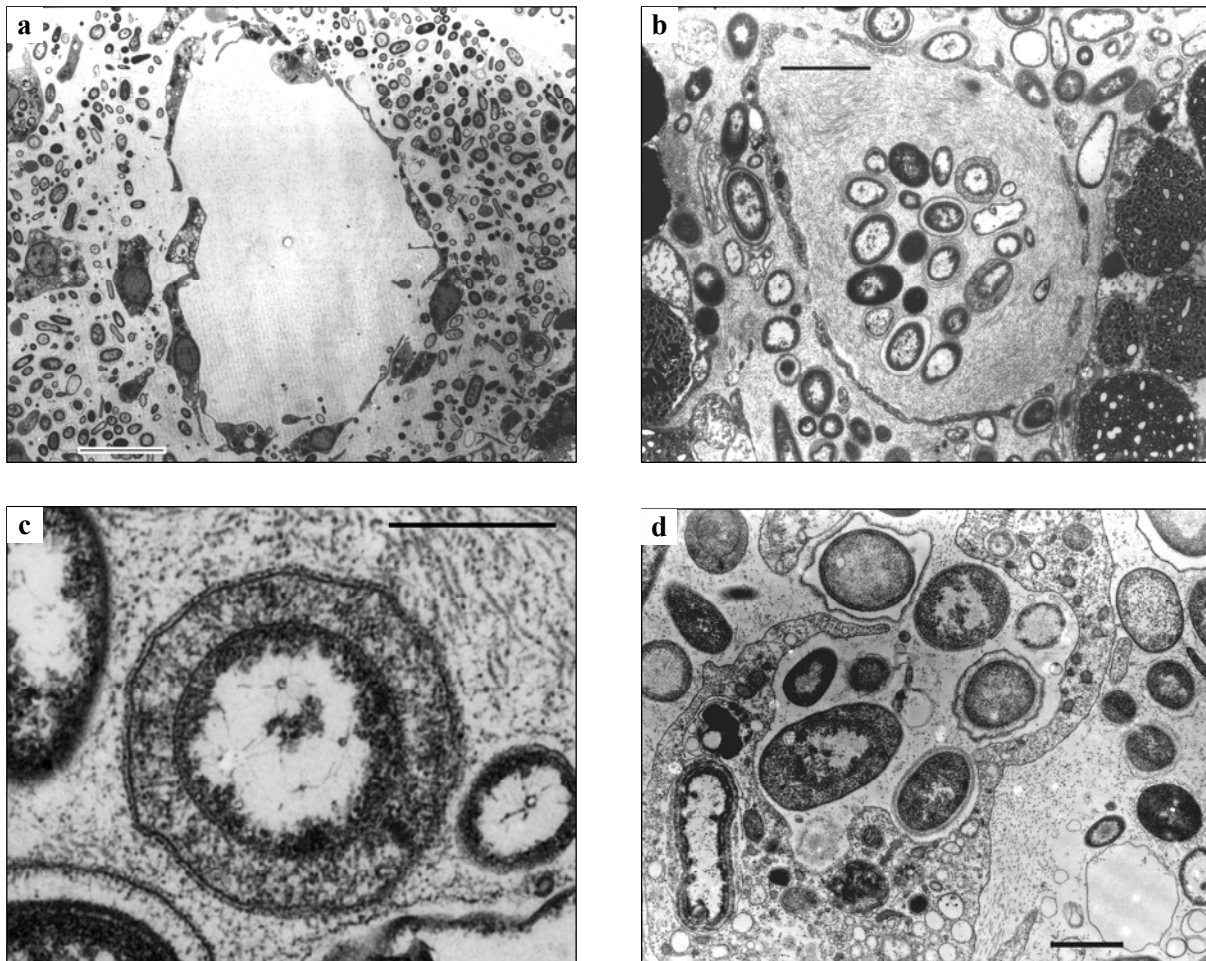
Um die Verbreitung von Symbionten in marinen Schwämmen zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden *Demospongiae* von den Bahamas, aus Florida und dem Mittelmeer untersucht. Die untersuchten Spezies kommen häufig in den Habitaten vor und haben so erheblichen Anteil an der Schwammfauna. Beschreibungen zur Abundanz, Morphologie, Anatomie und Taxonomie der untersuchten Schwämme sind in der Bestimmungsliteratur (Human & DeLoach 1996) und in taxonomischen Werken zu finden (Hooper et al. 2002). Für die Studie wurden von jeweils drei verschiedenen Individuen einer Spezies Gewebeproben des inneren Mesohylbereichs untersucht. Diese Gewebebereiche waren für das Vorliegen von extrazellulären, nicht-phototrophen Symbionten beschrieben worden (Vacelet 1975, Vacelet & Donadey 1977). Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, dass *Demospongiae* bezüglich ihres Bakteriengehalts im Mesohyl in zwei deutlich unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können.

##### 4.1.1.1 Bakterienhaltige Schwämme

Die Gruppe der bakterienhaltigen Schwämme wurde durch das Vorliegen einer hohen Anzahl von Bakterien in der extrazellulären Matrix (ECM) charakterisiert. Folgende untersuchte Arten wurden der Gruppe der stark bakterienhaltigen Schwämme zugeordnet: *Aplysina aerophoba* (Abb. 4.1.2a), *A. cavernicola* (Abb. 4.1.2b), *A. archeri* (Abb. 4.1.2c), *A. lacunosa* (Abb. 4.1.2d), *A. cauliformis*, var. dick (Abb. 4.1.2e), *A. cauliformis*, var. dünn (Abb. 4.1.2f), *A. insularis* (Abb. 4.1.2g), *A. fistularis* (Abb. 4.1.2h), *Chondrosia reniformis* (Abb. 4.1.2i), *Sphaciospongia cuspidifera* (Abb. 4.1.2j), *Verongula gigantea* (Abb. 4.1.2k), *Smenospongia aurea* (Abb. 4.1.2l) und *Xestospongia muta* (Abb. 4.1.2m). Die Schwämme dieser Gruppe wiesen einen geordneten Aufbau des Gewebes mit einer klaren Gliederung in Mesohyl, Pinacoderm und Choanoderm auf. Die Abtrennung des Mesohyls gegenüber dem Seewasser erfolgte im Bereich der Choanozytenkammern durch das Choanoderm

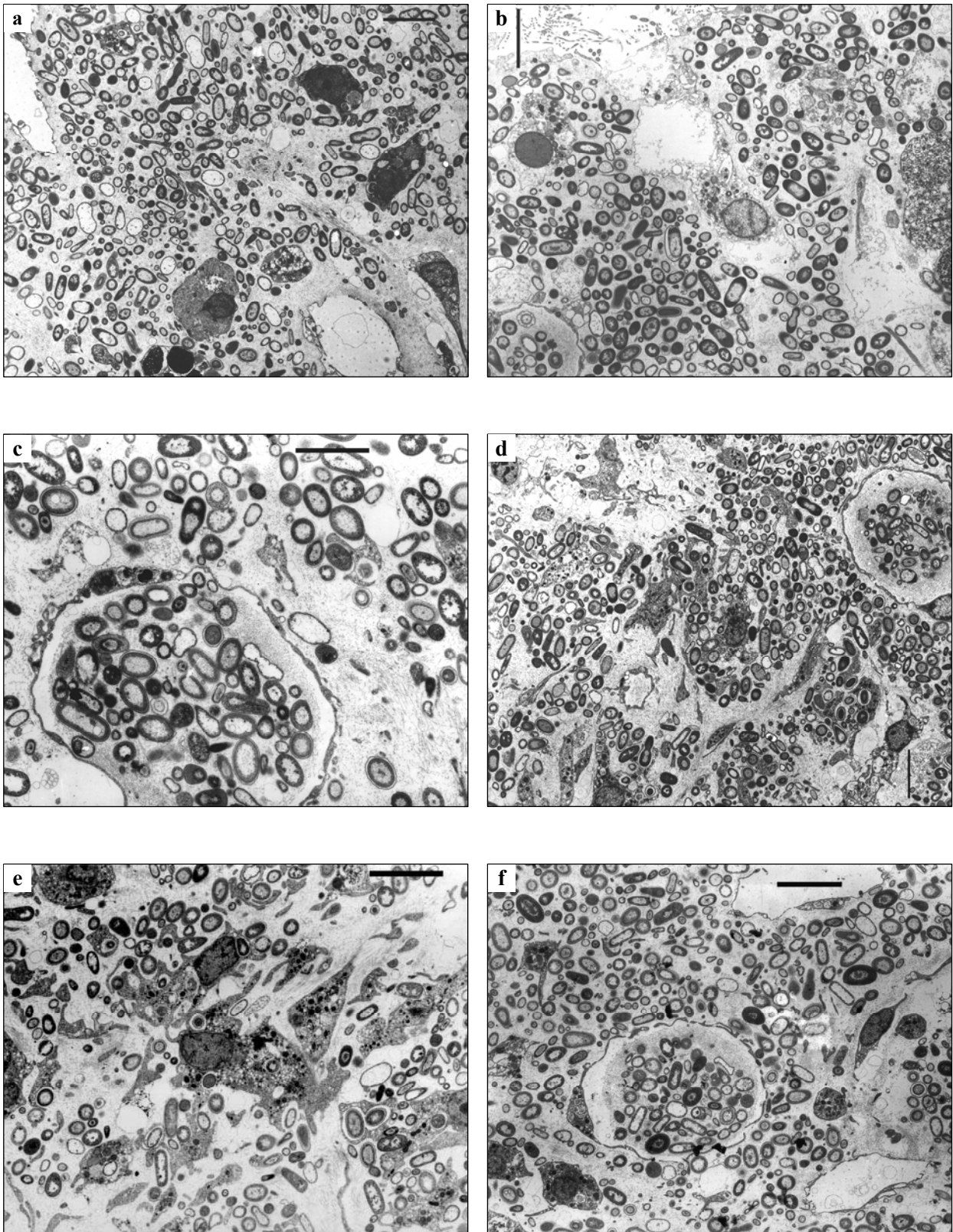
(Abb. 4.1.2g) und im Bereich der Wasserkanäle durch das, aus langgestreckten Zellen bestehende, Pinacoderm (Abb. 4.1.1a). Bei diesen epithelartigen Zellschichten wurden jedoch keine Zell-Zellverbindungen wie „tight junctions“, „intermediate junctions“ und Desmosomen gefunden. Auch Hinweise auf Rudimente dieser, unter Umständen durch Artefakte zerstörten, Strukturen konnten nicht gefunden werden, sodass mikroskopische Hinweise für ein echtes, funktionelles Epithel bislang fehlen. Die Schwammzellen des Mesohyls lagen verstreut vor, nur vereinzelt wurden Aggregationen mit Zell-Zell-Kontakt beobachtet. In der massiv ausgebildeten ECM waren elektronenmikroskopisch oftmals fibrilläre Strukturen auflösbar (Kollagenfibrillen). Sponginfasern oder ähnliche Skelettelemente, wichtig für die mechanische Stabilität der Schwämme, hatten einen untergeordneten Anteil.

Bei den untersuchten Spezies wurden große Anteile des extrazellulären Raums durch Prokaryotenzellen eingenommen. Die Bakterien wiesen eine homogene Verteilung in der ECM auf. Vereinzelt traten an wenigen Untersuchungsstellen leichte Variationen in der bakteriellen Zelldichte auf. Diese Bereiche wurden von einer dicht mit Kollagenfibrillen durchsetzten ECM eingenommen. Die beobachteten Bakterien konnten diversen, bereits beschriebenen, Morphotypen zugeordnet werden (Vacelet 1975, Friedrich et al. 1999, Fieseler et al. 2004). Typischerweise wurden in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft ganz verschiedene Morphotypen gefunden. Lokale Anhäufungen einzelner Morphotypen wurden nicht beobachtet. Anatomische Umorganisationsprozesse innerhalb des Schwammgewebes und die Mobilität der Amöbozyten und Archaeozyten scheinen für alle Schwämme eine große Rolle zu spielen (Reiswig 1971 II) und ermöglichen eine hohe morphologische Plastizität und Regenerationsfähigkeit, z. B. des Wasserkanalsystems (Abb.4.1.1a). Bei bakterienhaltigen Schwämmen sorgt die hohe Anzahl der im Mesohyl eingebetteten Bakterienzellen jedoch für mechanische Rigidität und vermindert die Mobilität der Schwammzellen. Als Anzeichen für mögliche Umstrukturierungen des Gewebes wurden die zahlreich gefundenen ringförmigen Strukturen, wie in Abbildung 4.1.1b (siehe auch Abb. 4.1.2b, c, d, f, h, k) angesprochen. Bei diesen waren ECM und Bakterienzellen von kreisförmig angeordneten, dünn ausgezogenen Endopinacozyten-artigen Zellen umgeben. Diese Anordnung von Schwammzellen entspricht anatomisch der eines Wasserkanals. Die progressive Entwicklung dieser geordneten Strukturen wurde nicht explizit untersucht, jedoch gilt als wahrscheinlich, dass hier neue Wasserkanäle durch Bereiche des Mesohyls angelegt wurden.



**Abb. 4.1.1a - d:** Mesohyl und Symbionten von *A. aerophoba*. **a:** Wasserkanal, 8,0  $\mu\text{m}$ ; **b:** Wasserkanalartige Struktur gefüllt mit Prokaryoten und Kollagenfasern, 2,0  $\mu\text{m}$ ; **c:** Detailvergrößerung aus b, eingeschlossenes Bakterium mit Nucleoid, 500 nm; **d:** Phagozytose von Symbionten im Mesohyl, 1,0  $\mu\text{m}$ .

Bei den eingeschlossenen Bakterien wurden zahlreiche Zellen mit Nucleoid-Struktur gefunden (Abb. 4.1.1c). Sie entsprachen dem Morphotyp E nach Vacelet (1975). Dieser Morphotyp ist ein charakteristischer Vertreter der Mesohylbakterien (Fuerst et al. 1998, Friedrich et al. 1999), er wird als bakterieller Symbiont angesprochen. Untersuchungen der *Poribacteria* deuteten darauf hin, dass diese dem Typ E entsprechen könnten (Fieseler et al. 2004). Eine Einwanderung von Amöbozyten oder Archeozyten in die ringförmigen Strukturen und Phagozytoseprozesse wurden nicht beobachtet. Phagozytose von Symbionten im Mesohyl erfolgte typischerweise durch einzeln vorliegende Amöbozyten ohne Ausbildung hochgeordneter Zellstrukturen (Abb. 4.1.1d).



**Abb. 4.1.2a - f:** Mesohyl der bakterienhaltigen Schwämme. **a:** *Aplysina aerophoba*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **b:** *Aplysina cavernicola*, 4,0  $\mu\text{m}$ ; **c:** *Aplysina archeri*, 3,0  $\mu\text{m}$ ; **d:** *Aplysina lacunosa*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **e:** *Aplysina cauliformis*, Variante dick, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **f:** *Aplysina cauliformis*, Variante dünn, 5,0  $\mu\text{m}$ .



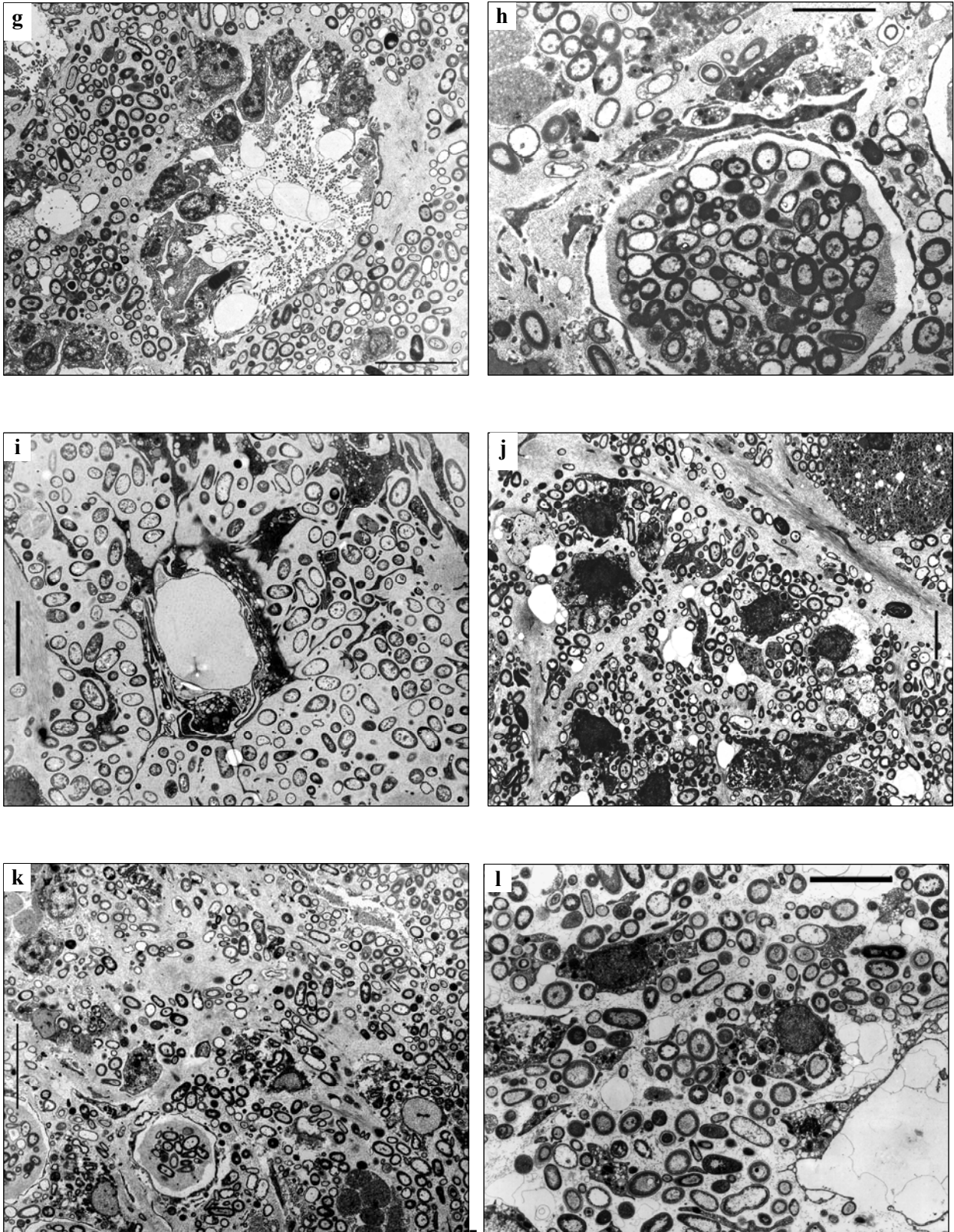
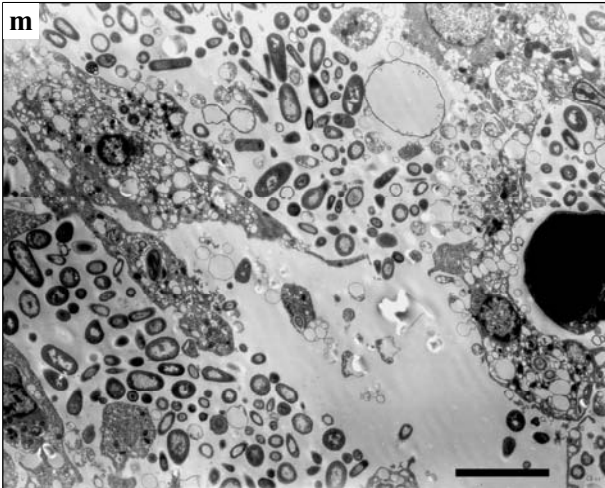
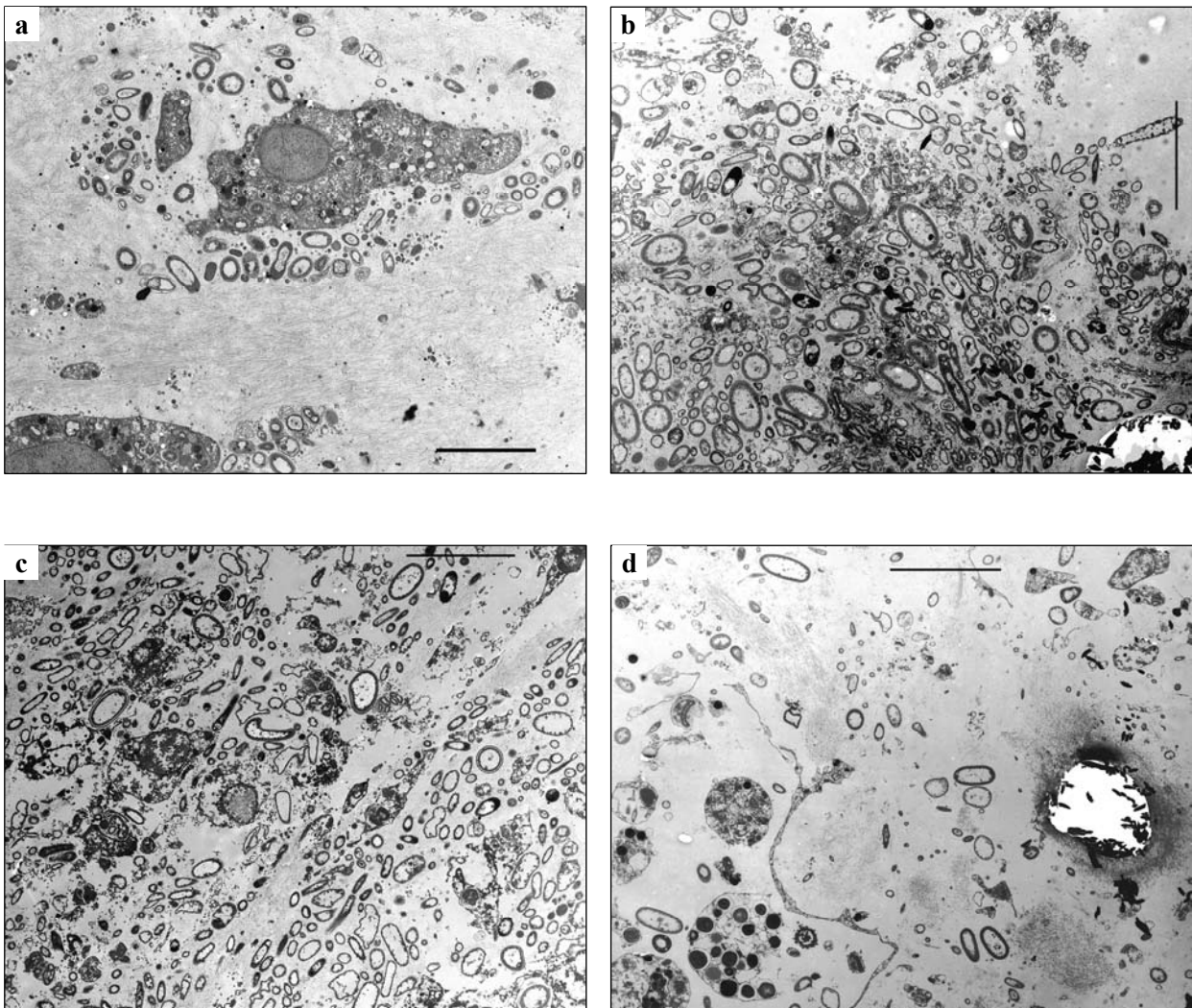


Abb. 4.1.2g - l: Mesohyl der bakterienhaltigen Schwämme. g: *Aplysina insularis*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; h: *Aplysina fistularis*, 3,0  $\mu\text{m}$ ; i: *Chondrosia reniformis*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; j: *Spheciospongia cuspidifera*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; k: *Verongula gigantea*, 8,0  $\mu\text{m}$ ; l: *Smenospongia aurea*, 4,0  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 4.1.2m:** Mesohyl des bakterienhaltigen Schwamms *Xestospongia muta*, 5,0  $\mu\text{m}$ .

Die untersuchten Spezies *Ircinia felix* (Abb. 4.1.3a), *Agelas dilatata* (Abb. 4.1.3b), *Agelas citrina* (Abb. 4.1.3c) und *Agelas wiedenmayeri* (Abb. 4.1.3d) wurden als bakterienhaltige Schwämme mit intermediärem Bakteriengehalt klassifiziert. Bei allen untersuchten Präparaten wurden Bakterien im Mesohyl nachgewiesen. Im Gegensatz zu den stark bakterienhaltigen Schwämmen lagen bei diesen Arten jedoch die Bakterien nicht mit hoher Dichte im gesamten Mesohyl vor. Für *I. felix* und *A. dilatata* wurden begrenzte Bereiche mit sehr hoher bakterieller Dichte gefunden. Diese Bakterien-„cluster“ waren weiträumig von bakterienfreier ECM umgeben. Für die Species *A. citrina* und *A. wiedenmayeri* wurde eine eher gleichmäßig-vereinzelte Verteilung der Bakterienzellen beobachtet.



**Abb. 4.1.3a - d:** Mesohyl der bakterienhaltigen Schwämme mit intermediärem Bakteriengehalt. **a:** *Ircinia felix*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **b:** *Agelas dilatata*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **c:** *Agelas citrina*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **d:** *Agelas wiedenmayeri*, 8,0  $\mu\text{m}$ .

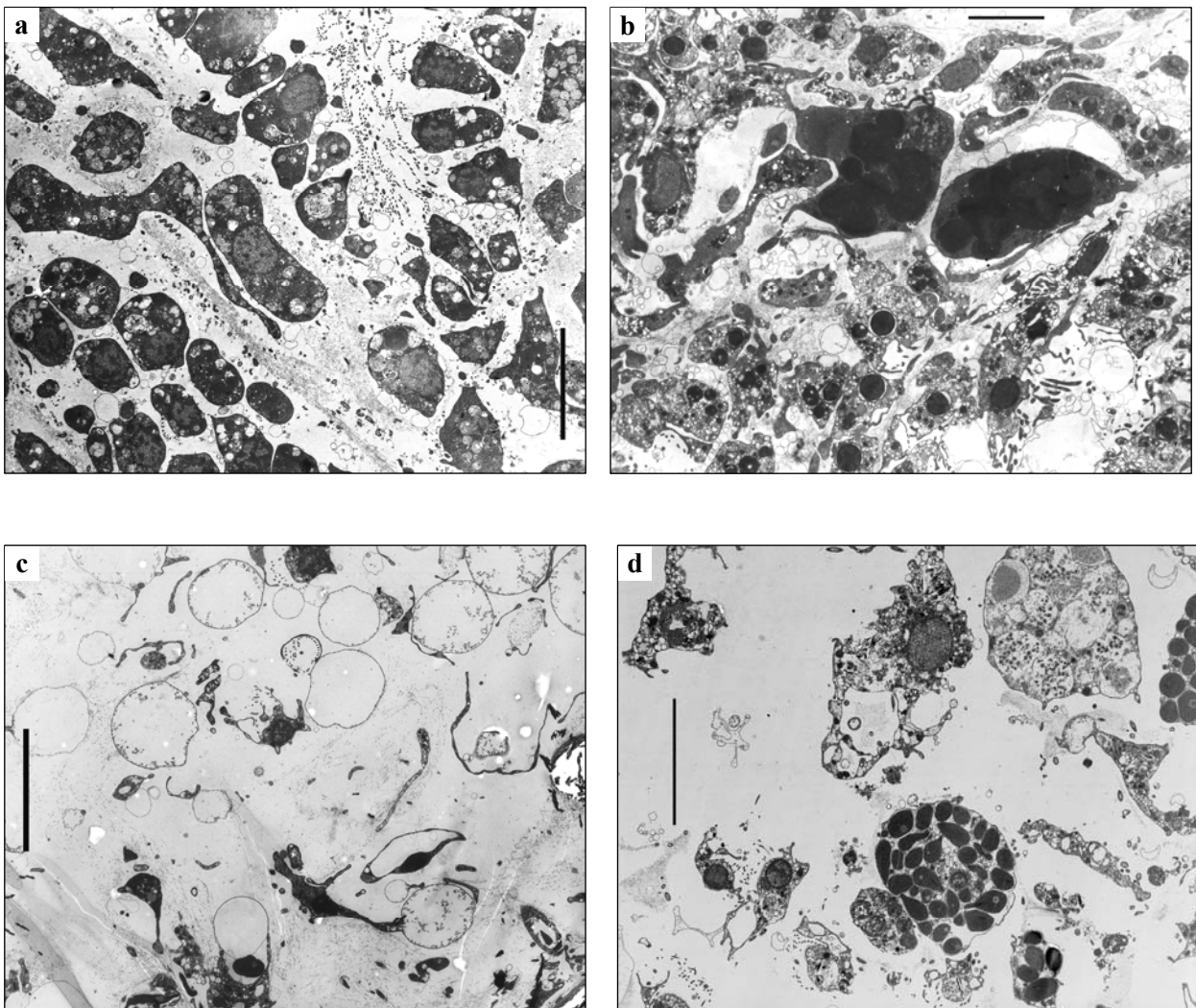
#### 4.1.1.2 Bakterienarme Schwämme

Die Gruppe der bakterienarmen Schwämme wird durch ein Mesohyl mit einer oft sehr massiven extrazellulären Matrix (ECM) charakterisiert, die frei von Prokaryoten ist. Folgende untersuchte Schwammspecies wurden der Gruppe der bakterienarmen Schwämme zugeordnet: *Dysidea avara* (Abb. 4.1.4a), *Tethya aurantium* (Abb. 4.1.4b), *Suberites domuncula* (Abb. 4.1.4c), *Axinella polypoides* (Abb. 4.1.4d), *Crambe crambe* (Abb. 4.1.4e), *Monanchora arbusculum* (Abb. 4.1.4f), *Ptilocaulis* sp. (Abb. 4.1.4g), *Iotrochota birotulata* (Abb. 4.1.4h), *Chalinula molytba* (Abb. 4.1.4i), *Niphates erecta* (Abb. 4.1.4j), *Niphates digitalis* (Abb. 4.1.4k), *Callyspongia vaginalis* (Abb. 4.1.4l), *Ulosa ruetzleri* (Abb. 4.1.4m), *Tedania ignis* (Abb. 4.1.4n) und *Mycale laxissima* (Abb. 4.1.4o).

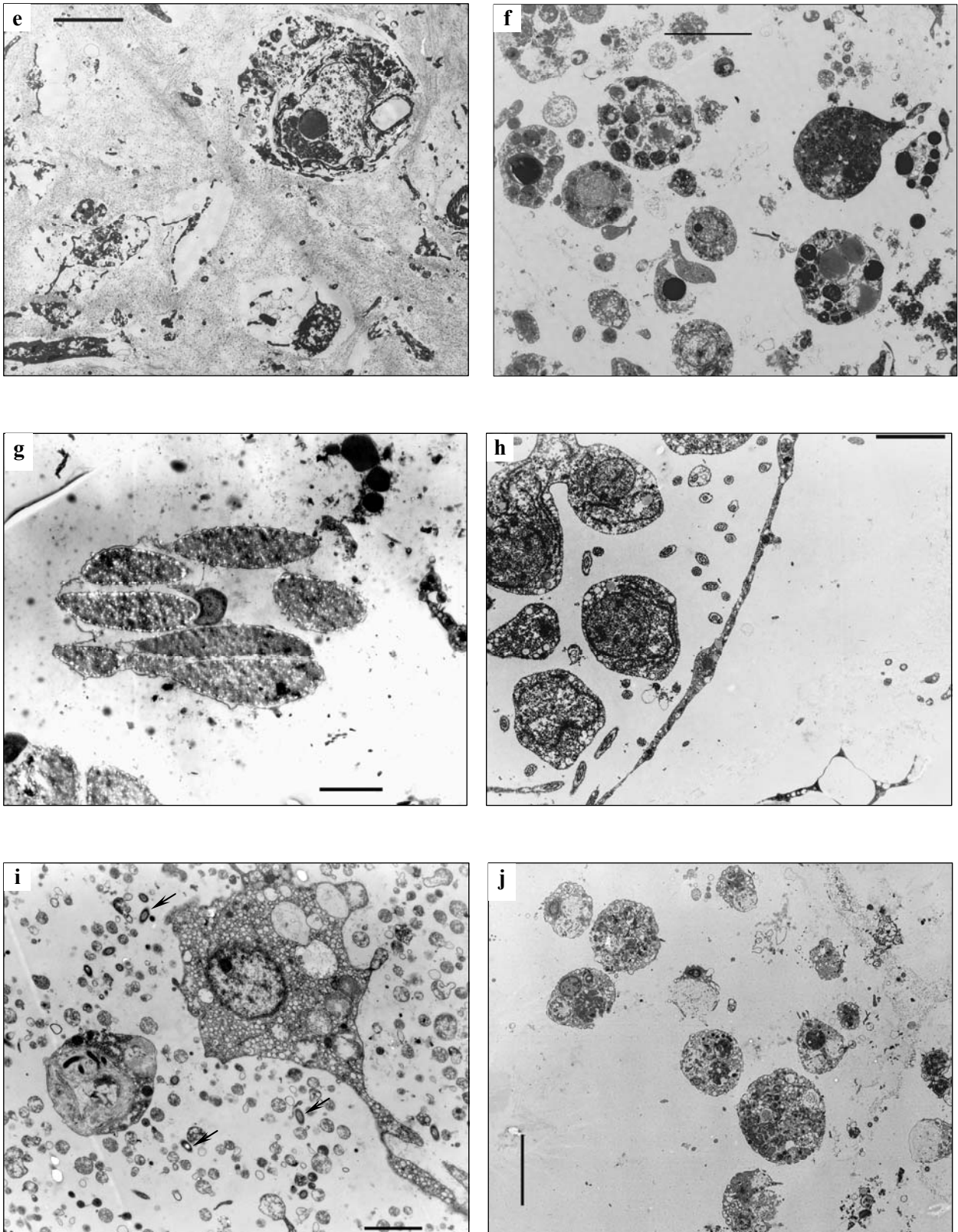
Der bakterienarme Schwamm *D. avara* wies einen vergleichsweise geordneten Gewebeaufbau auf. Es wurden keine Wasserkanäle mit der typischen Endozytenauskleidung beobachtet, wasserführende Bereiche waren stets mit Choanoderm ausgekleidet (Abb. 4.1.4a). Die hohe Anzahl von Choanozyten ermöglicht die beobachtete starke Pumpaktivität des Schwamms *in vivo*. Die in den schmalen Mesohylbereichen eingebetteten Schwammzellen waren mit zahlreichen elektronentransparenten Vesikeln gefüllt, ebenso wurden aber auch elektronendichte „residual bodies“ gefunden, die als Indiz für Phagozytoseaktivität gelten. Bei *T. aurantium* wurden große Gewebeanteile von Skleriten dominiert, diese waren als Strongyloxeae, Spheraster und Microaster ausgebildet. Die elektronenmikroskopische Analyse des Gewebes im Übergangsbereich von Cortex zu tieferem Gewebe ergab eine sehr kompakte Anordnung von Schwammzellen (Abb. 4.1.4b). Im cortextnahen Bereich fanden sich fast ausschließlich großvolumige Zellen, gefüllt mit großen, elektronendichten Vesikeln. Sie dienen vermutlich als Speicherzellen. Im weiter innen liegenden Gewebe dominierte Choanoderm und eng zusammen liegende Amöbozyten, gefüllt mit zahlreichen kleinen Vesikeln. Die übrigen Schwammspecies zeigten als Charakteristikum eine sehr stark ausgebildete ECM. Schwammzellen waren mehr oder weniger verstreut eingebettet, sodass ihr Anteil am gesamten Gewebe als niedrig eingeschätzt wurde. Bei den diversen Präparaten konnte kein regelmäßiger Gewebeaufbau mit einer klaren Untergliederung in Mesohyl, Pinacoderm und Choanoderm erkannt werden. Oftmals wurden Choanozyten, oder deren Cilien, inmitten des Mesohyls beobachtet (Abb. 4.1.4h), was auf eine Umorganisation des Gewebes hindeutete. Die ECM war je nach Species und auch innerhalb eines Individuums sehr unterschiedlich zusammengesetzt. Bei *N. erecta*, *N. digitalis* und *C. vaginalis* dominierte eine im EM nicht auflösbare ECM, bei anderen Species, wie *T. ignis* und *D. avara*, lagen

zahlreiche Kollagenfibrillen im Mesohyl vor. Bei der Untersuchung von *M. laxissima* wurde eine sehr massive ECM mit laminarer Schichtung gefunden. Schwammzellderivate wurden nur sehr vereinzelt in aufgelockerten (elektronentransparenten) ECM-Bereichen beobachtet.

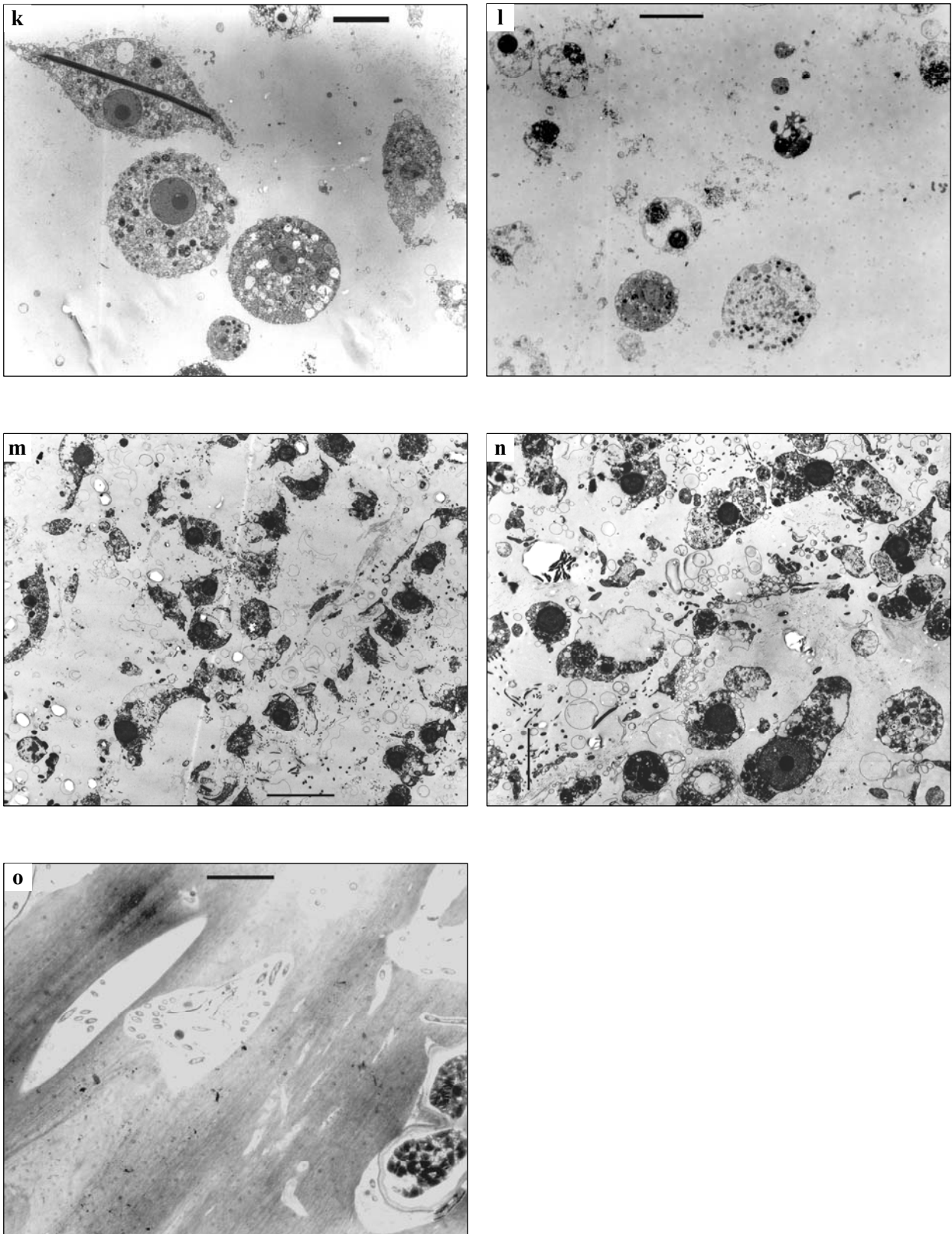
Hinweise für das Vorliegen von Bakterien außerhalb der Wasserkanäle konnten nicht erbracht werden. Bei einigen Schwämmen wie *A. polypoides* und *C. crambe* wurden in der ECM zahlreiche kleine Vesikel gefunden. Diese wurden als Derivate von Schwammzellen oder mögliche Artefakte gedeutet. Morphologisch handelte es sich jedoch nicht um Bakterienzellen. Lediglich in *C. molytba* wurden kleine Strukturen gefunden, die Prokaryoten darstellen könnten (Abb. 4.1.4i, Pfeilmarkierung). Das Vorliegen solcher Strukturen war auf wenige Präparatstellen beschränkt und galt deshalb als nicht repräsentativ für den gesamten Schwamm.



**Abb. 4.1.4a - d:** Mesohyl der bakterienarmen Schwämme. **a:** *Dysidea avara*, 10 µm; **b:** *Tethya aurantium*, 5,0 µm; **c:** *Suberites domuncula*, 10 µm; **d:** *Axinella polypoides*, 10 µm.



**Abb. 4.1.4e - j:** Mesohyl der bakterienarmen Schwämme. **e:** *Crambe crambe*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **f:** *Monanchora arbusculum*, 10  $\mu\text{m}$ ; **g:** *Ptilocaulis* sp., 4,0  $\mu\text{m}$ ; **h:** *Iotrochota birotulata*, 3,0  $\mu\text{m}$ ; **i:** *Chalinula molytba*, 2,0  $\mu\text{m}$ ; **j:** *Niphates erecta*, 5,0  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 4.1.4k - o:** Mesohyl der bakterienarmen Schwämme. **k:** *Niphates digitalis*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **l:** *Callyspongia vaginalis*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **m:** *Ulosa ruetzleri*, 8,0  $\mu\text{m}$ ; **n:** *Tedania ignis*, 5,0  $\mu\text{m}$ ; **o:** *Mycale laxissima*, 5,0  $\mu\text{m}$ .

### 4.1.2 Bestimmung der mikrobiellen Zelldichte

Die durch die elektronenmikroskopische Studie dokumentierten Unterschiede zwischen bakterienhaltigen und –armen Schwämmen wurden durch eine Zellzahlbestimmung nach DAPI-Anfärbung quantifiziert. Eine annähernd vollständige Erfassung der bakteriellen Zellzahl wurde durch wiederholte Gewebedissoziation realisiert. Die Auszählung der unterschiedlichen Fraktionen ergab, dass schon bei der ersten Dissoziation über 80 % der Bakterien erfasst wurden. Von je drei Schwammindividuen wurden die Zellzahlen bestimmt und gemittelt. Die Ergebnisse der Auszählung sind, zusammen mit denen der Elektronenmikroskopie, in Tabelle 4.1.1 aufgelistet.

**Tab. 4.1.1:** Bakteriengehalt bei bakterienhaltigen und –armen Schwämmen. Angegeben sind die bakteriellen Zellkonzentrationen  $\text{g}^{-1}$  Schwamm, ermittelt durch quantitativen DAPI-Auszählung (Anzahl der untersuchten Individuen jeweils  $n = 3$ , nur *A. aerophoba*:  $n = 11$ ) zusammen mit der qualitativen elektronenmikroskopischen Beurteilung.

Spezies (Familie, Ordnung)	Bakteriengehalt	
	qualitativ (EM)	quantitativ (DAPI)
<b>bakterienhaltige</b>		
<i>Aplysina aerophoba</i> (Aplysinidae, Verongida)	+	$1,08 \pm 0,87 \times 10^{10}$
<i>Aplysina archeri</i> (Aplysinidae, Verongida)	+	$1,38 \pm 0,02 \times 10^9$
<i>Aplysina insularis</i> (Aplysinidae, Verongida)	+	$3,97 \pm 0,36 \times 10^{10}$
<i>Xestospongia muta</i> (Petrosiidae, Haplosclerida) *	+	$2,05 \pm 0,31 \times 10^{10}$
<b>intermediär bakterienhaltige</b>		
<i>Ircinia felix</i> (Irciniidae, Dictyoceratida)	+	$1,56 \pm 0,07 \times 10^9$
<i>Agelas dilatata</i> (Agelasidae, Agelasida)	+	$1,90 \pm 0,87 \times 10^8$
<b>bakterienarme</b>		
<i>Callyspongia vaginalis</i> (Callyspongiidae, Haplosclerida) **	-	$3,97 \pm 2,02 \times 10^6$
<i>Chalinula molytba</i> (Chalinidae, Haplosclerida)	-	$3,53 \pm 3,53 \times 10^6$
<i>Dysidea avara</i> (Dysideidae, Dictyoceratida)	-	$1,84 \pm 1,62 \times 10^7$
<i>Niphates digitalis</i> (Niphatidae, Haplosclerida) **	-	$\ll 5 \times 10^5$
<i>Ptilocaulis</i> sp. (Axinellidae, Halichondrida)	-	$\ll 5 \times 10^5$
<i>Tedania ignis</i> (Tedaniidae, Poecilosclerida) **	-	$\ll 5 \times 10^5$

\*: Für diese Spezies wurden Reproduktionsstadien von einem Individuum elektronenmikroskopisch untersucht, es wurden keine vertikal weitergegebenen Bakterien gefunden.

\*\* : Die EM-Untersuchung von Reproduktionsstadien (jeweils  $n = 3$  Individuen) erbrachte keine Hinweise auf das Vorliegen von Bakterien.



## 4.2 Quantifizierung der bakteriellen Aufnahme

Als marine Filtrierer nehmen Schwämme die im umgebenden Wasser enthaltenen Mikroorganismen auf. In Filtrationsexperimenten wurde das Aufnahmevermögen verschiedener bakterienhaltiger und bakterienarmer Schwämme untersucht. Getestet wurde die Aufnahme phylogenetisch diverser Isolate, des Seewasserkonsortiums und des Konsortiums der Schwammsymbionten. Durch weiterführende Inhibitionsexperimente wurde versucht, Einblicke in die bei der bakteriellen Aufnahme beteiligten Mechanismen zu erhalten.

### 4.2.1 Bakterienhaltige Schwämme

#### 4.2.1.1 *Aplysina aerophoba*

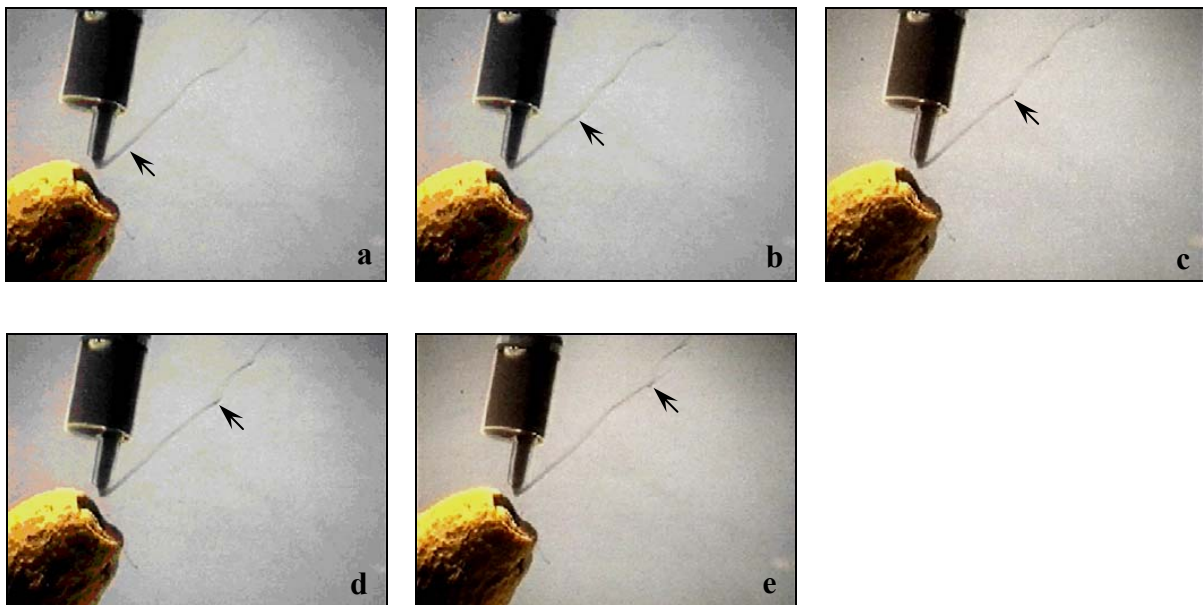
##### 4.2.1.1.1 Schätzung der Pumpleistung

Grundlage für die bakterielle Filtration der Schwämme ist die Pumpaktivität der Tiere. Beim Durchströmen der Wasserkanäle und insbesondere bei der Passage der Choanozytenkammern erfolgt die Filtration der Bakterien. Im folgenden wurde die tatsächliche Volumenspumpleistung von *A. aerophoba* durch Auswertung von Videomaterial geschätzt. Zur Visualisierung der generierten Wasserströmung wurde Tinte von *Sepia officinalis* in geringer Menge am Oscularbereich eines Schlotes appliziert. Durch die manuelle Zuführung ergaben sich leichte Diskontinuitäten im Tintenstrom. Diese Unregelmäßigkeiten wurden zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit verwendet. Durch Auswertung von zeitdefinierten Einzelbildern des Videomaterials wurde die Strömungsgeschwindigkeit bestimmt (Abb. 4.2.1a - e). In den dargestellten Bildern ist erkennbar, dass das austretende Wasser über die ersten 30 mm laminaren Strömungscharakter aufwies. Erst im weiter entfernten Bereich (>40 mm) kam es zur Wirbelbildung, zur deutlichen Verlangsamung und zur Aufweitung des Wasserstrahls. Die Vermessung der Einzelbilder ergab eine Strömungsgeschwindigkeit von  $21,3 \pm 4,2 \text{ mm s}^{-1}$  ( $n = 23$ ). Der Durchmesser der Oscularöffnung wurde mit 3,6 mm bestimmt, somit ergibt sich ein Fluss von  $13,0 \text{ ml min}^{-1}$ .

Aus den Bildaufzeichnungen wurde die Größe des Schlots abgeschätzt. Die Form eines fast perfekten Kegelstumpfs ermöglichte eine einfache Schätzung des Volumens, das mit etwa

24,6 ml angenommen wurde. Es ergibt sich eine Pumprate von  $0,53 \text{ ml g}^{-1}$  Schwamm (Nassmasse)  $\text{min}^{-1}$ , bzw.  $31,7 \text{ ml g}^{-1}$  Schwamm (Nassmasse)  $\text{h}^{-1}$ .

Unter der Annahme, dass die Pumpleistung der Schwämme mit der bakteriellen Filtrationsleistung streng korreliert ist, gilt die anhand der bakteriellen Filtration ermittelte Allometrie (Kap. 4.3). Unter Anwendung der Allometrie-Korrektur wird für den untersuchten Schwamm eine normalisierte Pumprate von  $16,0 \text{ ml h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  Schwamm (normalisiert auf 1 g Nassmasse eines ideellen „Prototyp“-Schwamms von 75 g Nassmasse) erhalten.



**Abb. 4.2.1a - e:** Einzelbildsequenz des Pumpens von *A. aerophoba*, visualisiert durch *Sepia*-Tinte. Der Pfeil kennzeichnet eine Inkontinuität des Tintenstroms, anhand dessen die Strömungsgeschwindigkeit gemessen wurde. **a:** 0 ms, **b:** 32 ms, **c:** 64 ms, **d:** 80 ms, **e:** 112 ms. Als Größenmaßstab diente die Spritze mit einem Durchmesser von 14,0 mm.

#### 4.2.1.1.2 Filtration kultivierbarer Isolate

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass *A. aerophoba* mit hoher Effizienz phylogenetisch unterschiedliche bakterielle Isolate zu filtrieren vermag (Wehrl 2001). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.2a - f zusammengefasst. Durch Kontrollen wurde die Überlebensfähigkeit, bzw. das Wachstum der Isolate überprüft. Über die Versuchsdauer von 300 min war bei allen getesteten Isolat: *Vibrio* sp. SB177 (Abb. 4.2.2a),  $\alpha$ -Proteobakterium SB89 (Abb. 4.2.2b), *Bacillus* sp. SB144 (Abb. 4.2.2c), *Pseudoalteromonas* sp. SB200 (Abb. 4.2.2d), *Pirellula* sp. SB81 (Abb. 4.2.2e) und *Pirellula marina* DSM3645 (Abb. 4.2.2f), eine Reduktion der bakteriellen Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle ermittelt worden. Tabelle 4.2.1 gibt die ermittelten normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  an, die vollständigen experimentellen Daten sind in Anhang A1 aufgelistet.

**Tab. 4.2.1:** Normalisierte Filtrationsraten  $r_n$  der getesteten Isolate.

Bakterienspecies	n	Normalisierte Filtrationsrate $r_n$
<i>Vibrio</i> sp. SB177	7	$2,76 \pm 0,21 \times 10^6$
$\alpha$ -Proteobakterium SB89	2	$2,35 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> sp. SB144	2	$2,13 \times 10^6$
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SB200	2	$2,60 \times 10^6$
<i>Pirellula</i> sp. SB81	2	$2,35 \times 10^6$
<i>Pirellula marina</i> DSM 3645	2	$1,74 \times 10^6$

$r_n$ : Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$

*A. aerophoba* verfügt über stark bioaktive Sekundärstoffe (Teeyapant et. al. 1993). Durch Kontrollexperimente war überprüft worden, ob bakterizide Effekte aufgetreten waren. Dazu waren zunächst Filtrationsexperimente durchgeführt worden. Nach 300 Minuten waren die Schwämme aus den Versuchsgefäßen entnommen worden und die Bakterienzahl durch Zugabe eines neuen Bakterieninokulums erhöht worden (Abb. 4.2.3a – c; aus Wehrl 2001). Parallel zu diesen Versuchen waren in Kontrollgefäßen Bakterien mit frischem Seewasser inkubiert worden. Weder bei Gram-negativen-Bakterien (*Vibrio* sp. SB177 und  $\alpha$ -Proteobakterium SB89) noch bei Gram-positiven-Bakterien (*Bacillus* sp. SB144) war eine Bioaktivität durch schwammspezifische Sekundärmetabolite feststellbar.

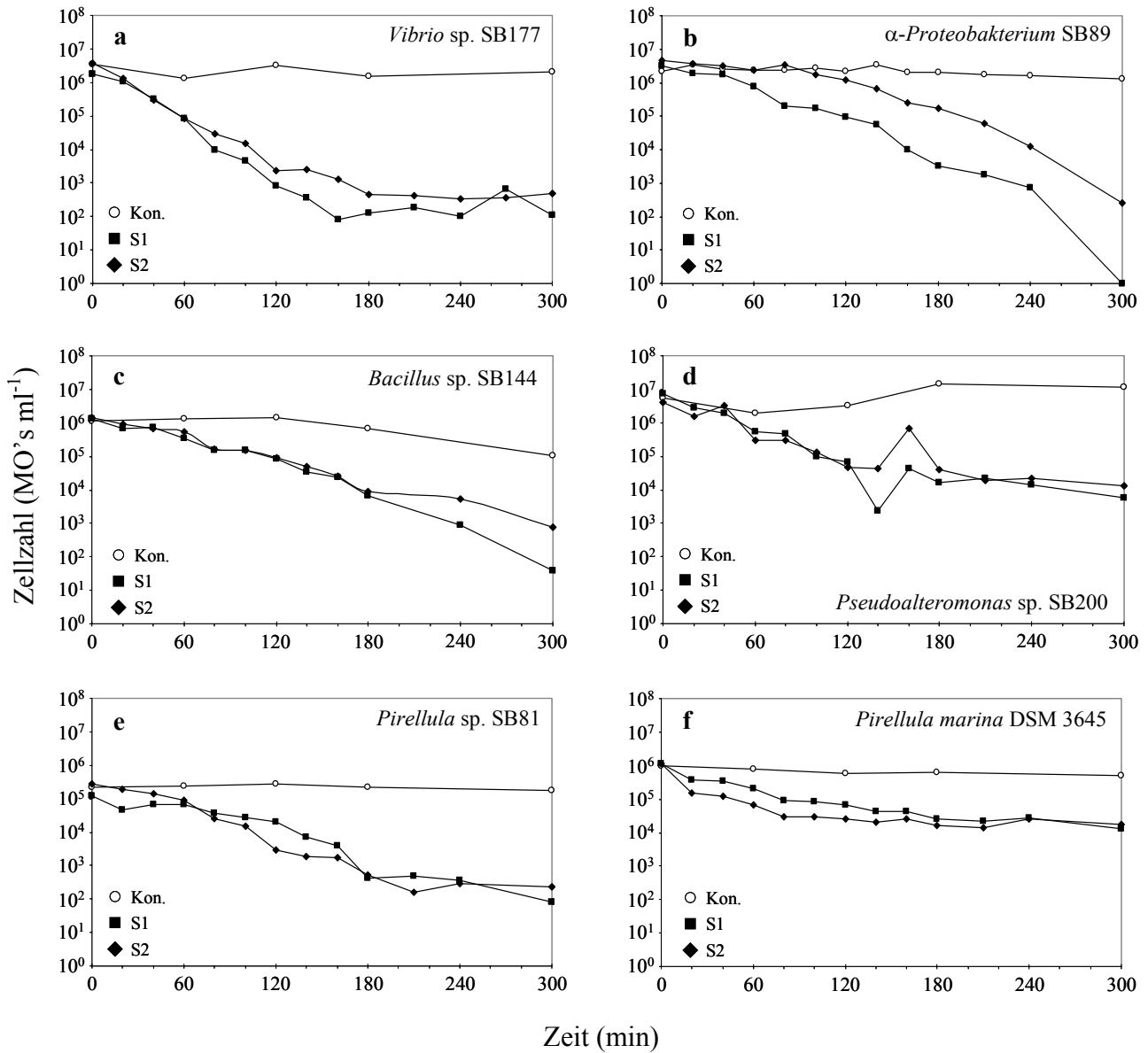
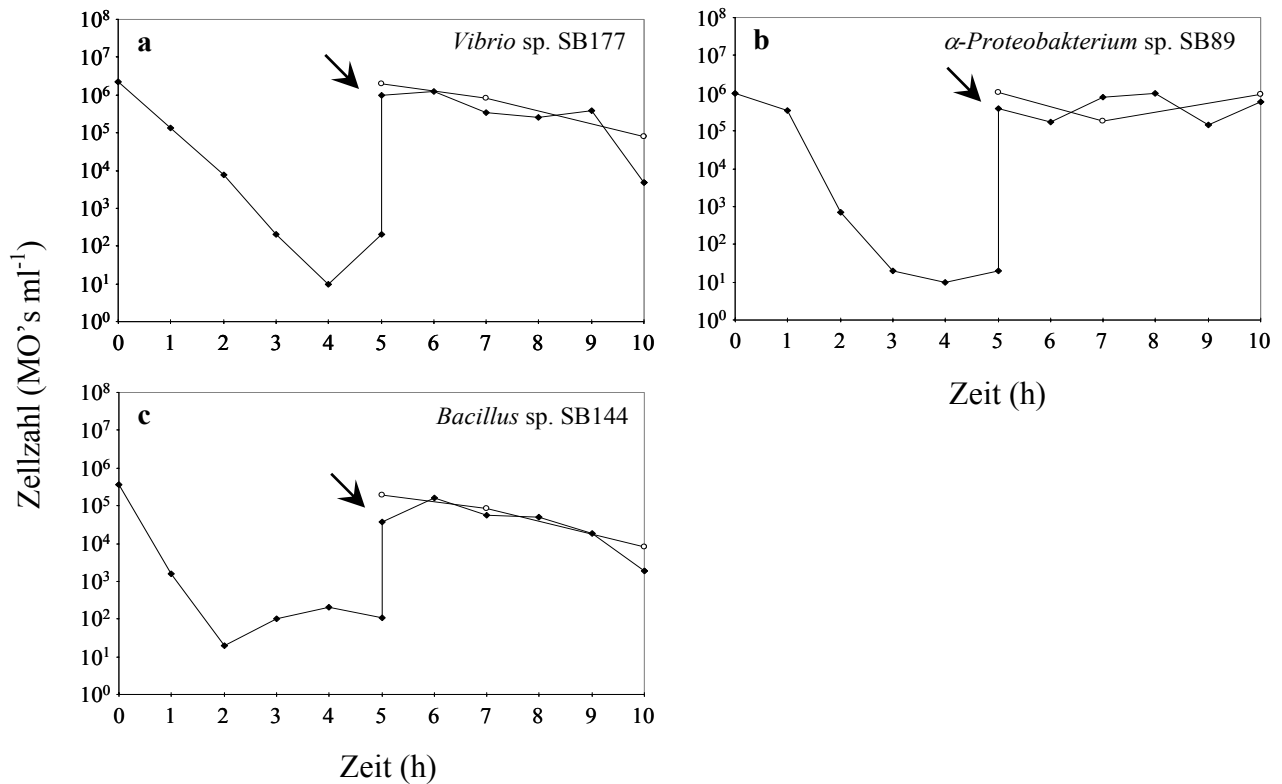
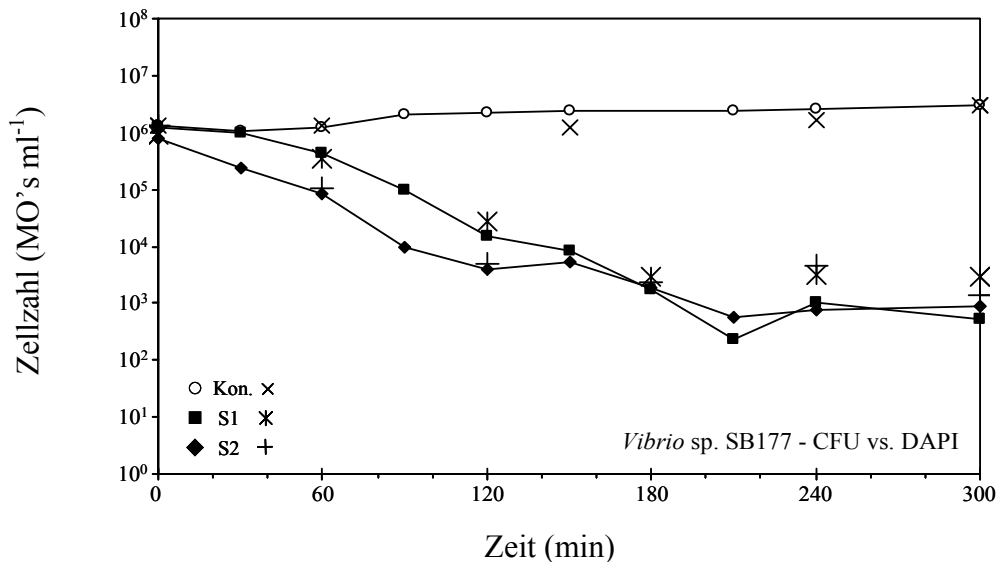


Abb. 4.2.2a - f: Filtration von bakteriellen Isolatzen durch *A. aerophoba*.



**Abb. 4.2.3a – c:** Kontrollexperiment für die Freisetzung von bioaktiven Sekundärstoffen aus *A. aerophoba*. Es wurden Filtrationsexperimente durchgeführt (gefüllte Symbole, 0 – 5 h), nach Entnahme der Schwämme wurde die Bakterienzahl durch Zugabe eines neuen Bakterieninokulums erhöht (Pfeil), es erfolgte Inkubation der Bakterienzellen im Inkubationswasser des Schwamms für weitere 5 h (geschlossene Symbole, 5 - 10 h). Als Kontrolle wurden Bakterien in frischem Seewasser inkubiert (offene Symbole, 5 - 10 h).

Da Bakterienzellen bei der Passage durch das Schwammgewebe eine Verminderung ihrer Teilungsfähigkeit erfahren könnten, ohne vom Schwamm aufgenommen zu werden, wurde ein Kontrollexperiment für die bakterielle Aufnahme mit kultivierungsunabhängiger Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die Bakterienzahl wurde als Lebendzellzahl und gleichzeitig durch DAPI-Auszählung bestimmt (Abb. 4.2.4). Als Testbakterium wurde *Vibrio* sp. SB177 verwendet, da dieses Isolat am effizientesten aufgenommen worden war. Die vollständigen Daten zu den einzelnen Schwämmen sind in Angang A1 aufgelistet. Durch die kultivierungsunabhängige Zellzahlbestimmung konnte die tatsächliche Reduktion der Bakterienzahl bestätigt werden. Im Bereich der annähernd exponentiellen Filtration (0 - 180 min) wurde für die auf beide Arten ermittelten Zellzahlen eine gute Übereinstimmung, mit einer Abweichung von durchschnittlich 0,09 log-Stufen, ermittelt. Für die späten Zeitpunkte (240 und 300 min) unterschieden sich die ermittelten Zellzahlen um durchschnittlich 0,55 log-Stufen. Für den Kontrollansatz betrug die Abweichung im Durchschnitt 0,09 log-Stufen.



**Abb. 4.2.4:** Kontrolle für die Reduktion der bakteriellen Zellzahl von *Vibrio* sp. SB177 durch *A. aerophoba*. Kreis- und Rechtecksymbole: Bestimmung der Lebendzellzahl, Kreuzsymbole: DAPI-Auszählung.

#### 4.2.1.1.3 Inhibition der bakteriellen Aufnahme

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde versucht, die bakterielle Aufnahme von *A. aerophoba* künstlich zu verändern. Die Experimente zielten auf die bei der Filtration beteiligten Mechanismen ab. Die vollständigen Daten zu den jeweiligen Experimenten sind in Anhang A5 zusammengefasst.

**Der Einfluss der bakteriellen Flagelle** auf die Aufnahme wurde durch Filtrationsexperimente mit *Vibrio fischeri*-Mutanten untersucht. *V. fischeri* ist als Symbiont der Sepienart *Euprymna scolopes* bekannt (Ruby 1996). Die Aufnahme des wildtypisch symbiontischen Stamms *Vibrio fischeri* ES114 (3 - 8 Flagellen, motil) wurde mit den beiden Mutanten *V. fischeri* DM61 (bis zu 15 Flagellen, hypermotil) und *V. fischeri* DM131 (keine Flagellen, nicht motil) verglichen. Es wurden jeweils zwei Filtrationsexperimente mit jedem *V. fischeri*-Stamm durchgeführt. Beim Vergleich der normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  wurde für *V. fischeri* DM131 eine um 19,8 %, für *V. fischeri* DM61 eine um 23,8 % verminderte Aufnahme, verglichen mit *V. fischeri* ES114, gemessen. Die gemessenen Unterschiede sind klein und deuten auf keinen deutlichen Einfluss der Flagellierung auf den Aufnahmeprozess hin.

**Eine Inhibition durch Konkurrenz wurde an folgenden Kohlenhydraten** getestet: D(-)-Fructose, D(+)-Fucose, D(+)-Galactose, D(+)-Glucose, D(-)-Mannit, D(+)-Mannose,  $\beta$ -Methylgalactose, D(+)-Maltose, D(+)-Saccharose und Thiodigalactose untersucht. Es wurden Vorexperimente an isolierten Schwammgewebestücken durchgeführt (siehe Wehr 2001). Die Kohlenhydrate wurden in Konzentrationen von 5 – 100 mM zum Inkubationswasser zugegeben. Vor Zugabe der Bakterienzellen wurden die Schwammgewebestücke im kohlenhydrathaltigen Inkubationswasser 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die ebenfalls kohlenhydrathaltigen Bakteriensuspensionen zugegeben und die Filtration gemessen. Als Testbakterium diente *Vibrio* sp. SB177. Bei dieser experimentellen Serie wurde eine Inhibition der bakteriellen Aufnahme lediglich für D(-)-Fructose gemessen. Eine 50 % Verminderung der Aufnahme wurde für eine Fructose-Konzentration von 2,95 mM bestimmt.

Um die Inhibition in Filtrationsexperimenten an intakten Schwämmen zu untersuchen, wurde mit erhöhten Konzentrationen von 15,0 mM ( $n = 4$ ) und 20,0 mM ( $n = 2$ ) gearbeitet. Die Auswertung der Experimente ergab eine durchschnittliche ( $n = 6$ ) normalisierte Filtrationsrate von  $r_n = 1,96 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ . Dies stellt eine Reduktion um 29,1 %, verglichen mit *Vibrio* sp. SB177 in unbehandeltem Seewasser, dar. Zur statistischen Beurteilung der Ergebnisse wurden die normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  aller sechs Experimente mit den  $r_n$ -Werten unbehandelter *Vibrio* sp. SB177-Zellen ( $n = 7$ ) verglichen. Es wurde ein Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die exakte, 2-seitige Signifikanz lag bei  $p_n = 13$ ;  $\alpha = 0,05 = 0,00466$ . Die Verminderung der bakteriellen Aufnahme in Gegenwart von Fructose ist somit statistisch signifikant.

**Der Einfluss von bakteriellen Zellwandproteinen** auf die bakterielle Aufnahme wurde an *Vibrio* sp. SB177 und Schwammsymbionten untersucht. Die Zellen wurden mit Proteinase K oder Papain behandelt, um Anteile der äußeren Zellwandproteine abzuspalten. Die zellfreien Überstände der Verdauungsansätze wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf abgespaltene Proteinfragmente geprüft. Für beide enzymatischen Behandlungen wurden zahlreiche Proteine mit Größen zw. 12 - 105 KDa nachgewiesen. In Vorversuchen an isolierten Schwammgewebestücken war ein deutlicher Effekt für die Behandlung mit jeder Protease beobachtet worden. Um den Effekt an intakten Schwämmen zu überprüfen, wurden Filtrationsexperimente mit Papain-behandelten *Vibrio* sp. SB177 durchgeführt. In den Experimenten ( $n = 2$ ) wurde eine starke Reduktion der bakteriellen Zellkonzentration, bei gleichzeitig ungewöhnlich starken Schwankungen der Zellzahl, gemessen

(Lebendzellzahlbestimmung). Die Auswertung ergab eine durchschnittliche normalisierte Filtrationsrate von  $r_n = 2,66 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ . Im Vergleich zu unbehandelten *Vibrio* sp. SB177-Zellen stellt dies eine Reduktion der Filtrationsrate um 3,7 % dar. Zur statistischen Beurteilung wurden die ermittelten  $r_n$ -Werte mit der Gruppe der unbehandelten *Vibrio* sp. SB177 ( $n = 7$ ) verglichen. Es wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die exakte, 2-seitige Signifikanz lag bei  $p_{n=9; \alpha=0,05} = 0,66667$ . Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Aufnahme von Papain-behandelten *Vibrio* sp. SB177 gezeigt werden. Alternativ zur Papain-Behandlung waren *Vibrio* sp. SB177-Zellen mit Proteinase K behandelt worden ( $n = 2$ ). Bei diesen Experimenten war ebenfalls eine starke Reduktion der Zellzahl, bedingt durch Schwammfiltration, gefunden worden.

In einer weiteren experimentellen Serie wurden Filtrationsversuche mit Papain-behandelten *Vibrio* sp. SB177 durchgeführt ( $n = 2$ ). Dabei wurde Chloramphenicol in sublethaler Konzentration ( $5 \mu g ml^{-1}$ ) zugesetzt, um die Proteinbiosynthese während der 300 minütigen Durchführung zu unterbinden. In diesen Experimenten wurde eine starke Reduktion der Zellzahl mit sehr starken Variationen gemessen, nach 40 min waren keine teilungsfähigen Zellen mehr nachweisbar. Die Ergebnisse wurden als Artefakte gedeutet, die vermutlich durch die starke mechanische Beanspruchung der angedauten bakteriellen Zellwand bei der Passage durch das Schwammgewebe zustande kamen.

Die vom Schwamm mit geringer Effizienz aufgenommenen bakteriellen Schwamm-symbionten (Kap. 4.2.1.1.5) wurden mit Papain behandelt. Die Zellen wurden nach der Enzymbehandlung mikroskopisch auf morphologische Intaktheit überprüft und in Filtrationsexperimenten, modifiziert für DGGE-Analysen, getestet ( $n = 2$ ). Die ermittelte durchschnittliche Filtrationsrate betrug  $r_n = 1,44 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ . Dieser Wert stimmt mit dem in Kap. 4.4.2, für unbehandelte Symbionten im DGGE-Experiment, bestimmten  $r_n$ -Wert ( $1,42 \times 10^6$ ) überein, sodass keine offensichtliche Veränderung der Aufnahmeeffizienz beobachtet werden konnte. Auch die DGGE-Analysen des Symbiontenkonsortiums ergaben im Vergleich zu unbehandelten Symbionten keine Veränderung des phylogenetischen Musters (Abb. 4.4.2).

**Durch verschiedene eukaryotische Inhibitoren** wurde versucht, die bakterielle Aufnahme zu inhibieren. Durch Cytochalasin D ( $20,0 \mu M$ ) und Colchicin ( $100 \mu M$ ) wird die Stabilität und Dynamik des Zytoskeletts verändert. Die eukaryotische Proteinbiosynthese wird durch Cycloheximid ( $355 \mu M$ ) inhibiert. Monodansylcadaverin ( $59,6 \mu M$ ) inhibiert die rezeptor-vermittelte Endozytose an Clathrin-umhüllten Vesikeln. Die Fusion von Phagosomen mit



Lysosomen und die nachfolgende proteolytische Degradierung aufgenommener Partikel wird durch Methylamin (100 mM) unterbunden. Die Versuche wurden an isolierten Schwammgewebestücken durchgeführt (Experimente nicht dargestellt). Für keinen der Inhibitoren konnte eine Veränderung der bakteriellen Aufnahme gegenüber den Kontrollen beobachtet werden.

#### 4.2.1.1.4 Filtration des bakteriellen Seewasserkonsortiums

Zur Ermittlung der Aufnahmeraten gegenüber bakteriellen Seewasserkonsortien wurde angereichertes Seewasser mit erhöhter Bakterienzahl verwendet. Diese methodische Modifikation war notwendig, um die am Versuchsende um 2 – 3 log-Stufen reduzierte Zellzahl über mikroskopische Auswertung bestimmen zu können. Das für die Anreicherung benutzte, natürliche Seewasser aus Rovinj (Kroatien, August 2003) wies eine natürliche Bakterienzahl von  $2,73 \times 10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  auf. Das im Experiment (Abb. 4.2.5) verwendete angereicherte Seewasser hatte eine Zellzahl von  $5,75 \times 10^6$  Bakterien  $\text{ml}^{-1}$ . Es wurde eine durchschnittliche ( $n = 4$ ) normalisierte Filtrationsrate von  $r_n = 1,90 \pm 0,73 \times 10^6$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Schwamm  $\text{h}^{-1}$  ermittelt (Anhang A1).

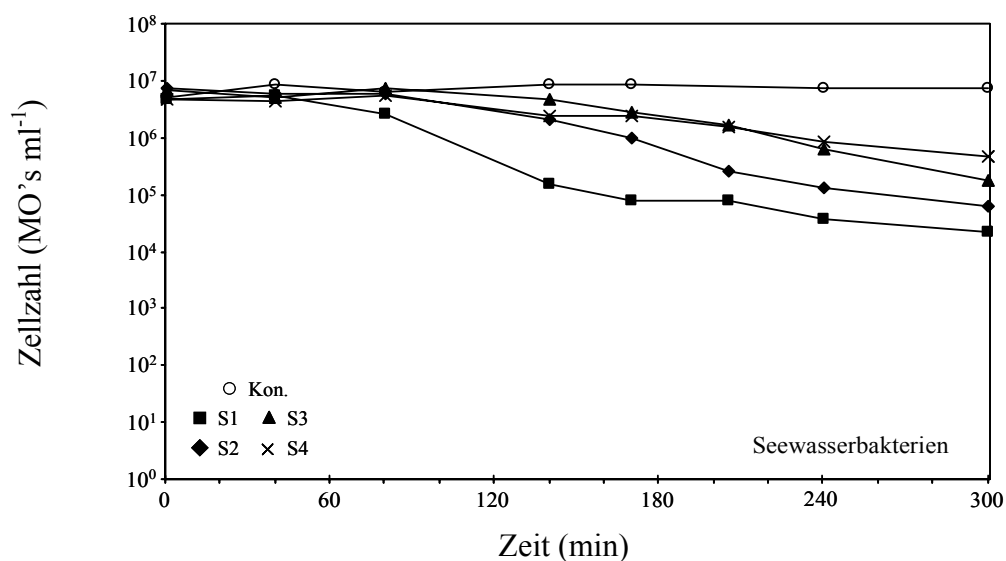
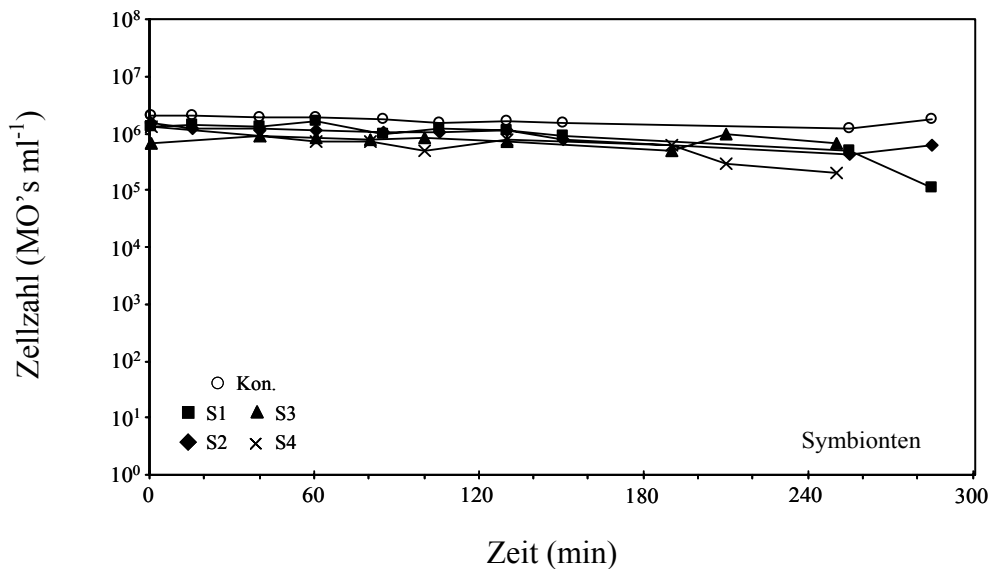


Abb. 4.2.5: Filtration des bakteriellen Seewasserkonsortiums durch *A. aerophoba*.

#### 4.2.1.1.5 Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums

Um die Aufnahme von schwammeigenen Symbionten zu testen, wurde das bakterielle Konsortium eines *A. aerophoba*-Individuums durch Gewebedissoziation isoliert, gewaschen und die Aufnahme an anderen Schwammindividuen getestet. Während der Experimente wurde die Pumpaktivität der Schwämme überprüft. In den Filtrationsexperimenten wurde eine sehr geringe Filtrationsaktivität beobachtet (Abb. 4.2.6). Die durchschnittliche ( $n = 4$ ) normalisierte Filtrationsrate lag bei  $r_n = 5,37 \pm 3,65 \times 10^4$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  (Anhang A1).



**Abb. 4.2.6:** Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums durch *A. aerophoba*.

Da bei der Präparation der Symbionten eine Behandlung mit EDTA erfolgte, wurde der mögliche Einfluss des Chelators überprüft. *Vibrio* sp. SB177-Zellen wurden einer gleichartigen Inkubation mit EDTA unterzogen und anschließend die Aufnahme getestet (Experimente nicht dargestellt). Die durchschnittliche ( $n = 2$ ) normalisierte Filtrationsrate betrug  $r_n = 2,70 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  (Anhang A1). Zur statistischen Beurteilung wurden die  $r_n$ -Werte mit denen der unbehandelten *Vibrio* sp. SB177 ( $n = 7$ ) verglichen. Es wurde ein Mann-Whitney-U-Test angewandt, die exakte, 2-seitige Signifikanz lag bei  $p_{n=9; \alpha=0,05} = 0,88889$ , somit liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Behandlung mit EDTA vor.

### 4.2.1.2 *Chondrosia reniformis*

#### 4.2.1.2.1 Filtration von *Vibrio* sp. SB177

Als weiterer Modellorganismus für bakterienhaltige Schwämme wurde *C. reniformis* untersucht. Es wurde die Aufnahme von *Vibrio* sp. SB177 bestimmt (Abb. 4.2.7). Da für *C. reniformis* keine Daten für die Allometrie vorlagen, wurde die Filtrationsrate  $r$  bestimmt. Sie betrug durchschnittlich  $r = 4,56 \times 10^6$  Bakterien  $\text{g}^{-1}$  Schwamm  $\text{h}^{-1}$  ( $n = 2$ ) (Anhang A2).

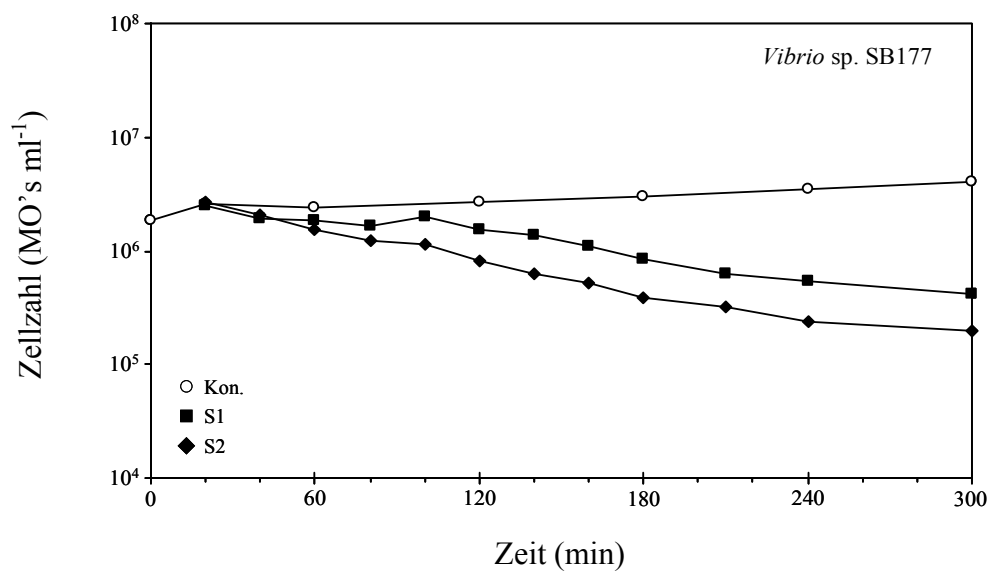


Abb. 4.2.7: Filtration von *Vibrio* sp. SB177 durch *C. reniformis*.

#### 4.2.1.2.2 Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums

Um die Aufnahme von Schwammsymbionten durch *C. reniformis* zu überprüfen, wurde das bakterielle Konsortium aus einem *A. aerophoba*-Individuum präpariert. Die isolierten Symbionten wurden an *C. reniformis* getestet (Abb. 4.2.8). Im Verlauf des Experiments konnte keine deutliche Reduktion der Bakterienzahl beobachtet werden. Es wurde eine durchschnittliche ( $n = 2$ ) Filtrationsrate von  $r = 1,20 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  gemessen, (Anhang A2).

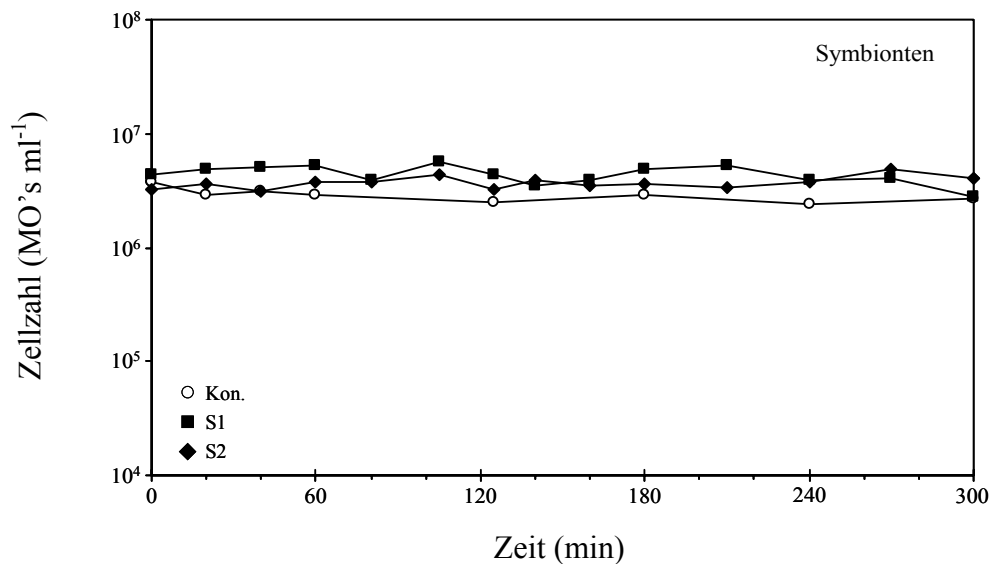


Abb. 4.2.8: Filtration von Schwammsymbionten durch *C. reniformis*.

## 4.2.2 Bakterienarme Schwämme

### 4.2.2.1 *Dysidea avara*

#### 4.2.2.1.1 Filtration von *Vibrio* sp. SB177

Die Aufnahme von *Vibrio* sp. SB177 wurde an dem als Modellorganismus für bakterienarme Schwämme dienenden *D. avara* getestet. Abbildung 4.2.9 zeigt zwei repräsentative von insgesamt sieben Experimenten. Es wurde eine starke Reduktion der Zellzahl beobachtet. Die durchschnittliche ( $n = 7$ ) normalisierte Filtrationsrate betrug  $r_n = 2,48 \pm 0,54 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  (Anhang A3).

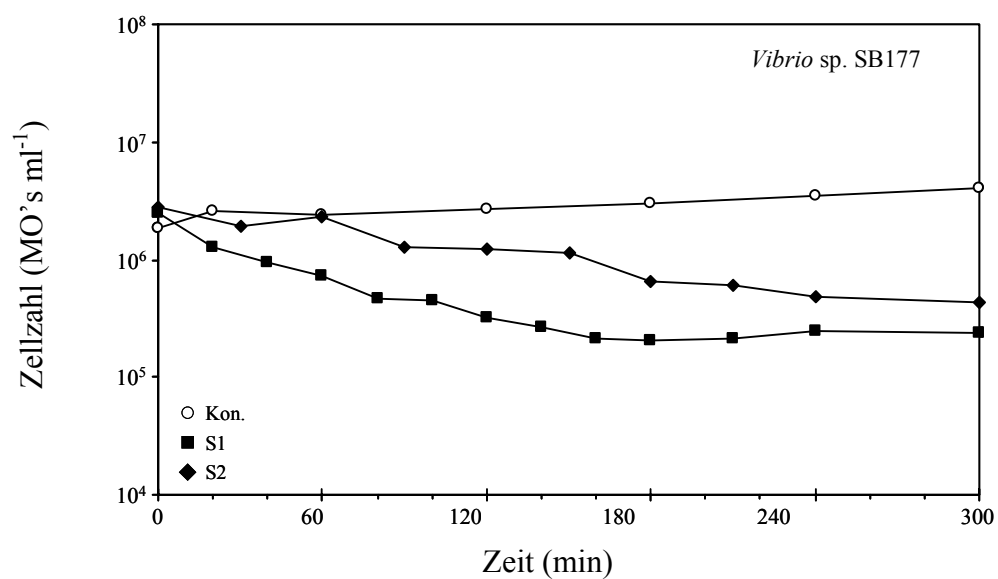


Abb. 4.2.9: Filtration von *Vibrio* sp. SB177 durch *D. avara*.

#### 4.2.2.1.2 Filtration des Schwammsymbionten-Konsortiums

Um die Interaktion des bakterienarmen Schwamms *D. avara* gegenüber Schwammsymbionten zu testen, wurde das bakterielle Symbiontenkonsortium aus *A. aerophoba* präpariert und an *D. avara* getestet (Abb. 4.2.10). Über den zeitlichen Verlauf von 300 min wurde eine starke Reduktion der Zellzahl beobachtet. Die durchschnittliche ( $n = 4$ ) normalisierte Filtrationsrate betrug  $r_n = 1,85 \pm 0,48 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  (Anhang A3).

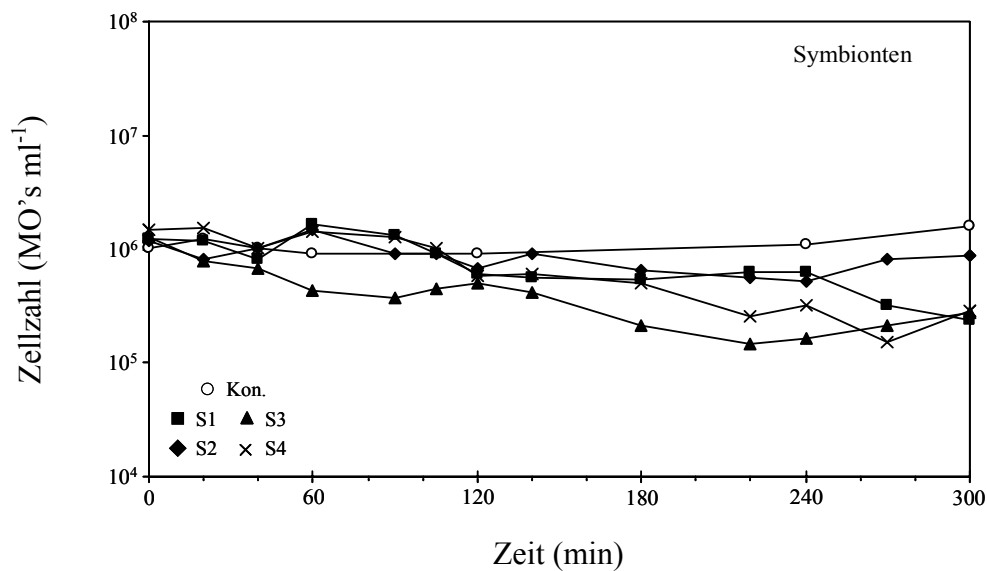


Abb. 4.2.10: Filtration von Schwammsymbionten durch *D. avara*.

### 4.2.2.2 *Tethya aurantium*

#### 4.2.2.2.1 Filtration kultivierbarer Isolate

Die bakterielle Filtrationsleistung des bakterienarmen Schwamms *T. aurantium* wurde an *Vibrio* sp. SB177 getestet (Abb. 4.2.11). Die untersuchten Schwämme vermochten die *Vibrio*-Zellen mit hoher Effizienz zu filtrieren. Da keine Daten zur Allometrie bei *T. aurantium* vorlagen, wurden Filtrationsraten  $r$  ermittelt. Sie betragen im Durchschnitt ( $n = 2$ )  $r = 1,38 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  (Anhang A4).

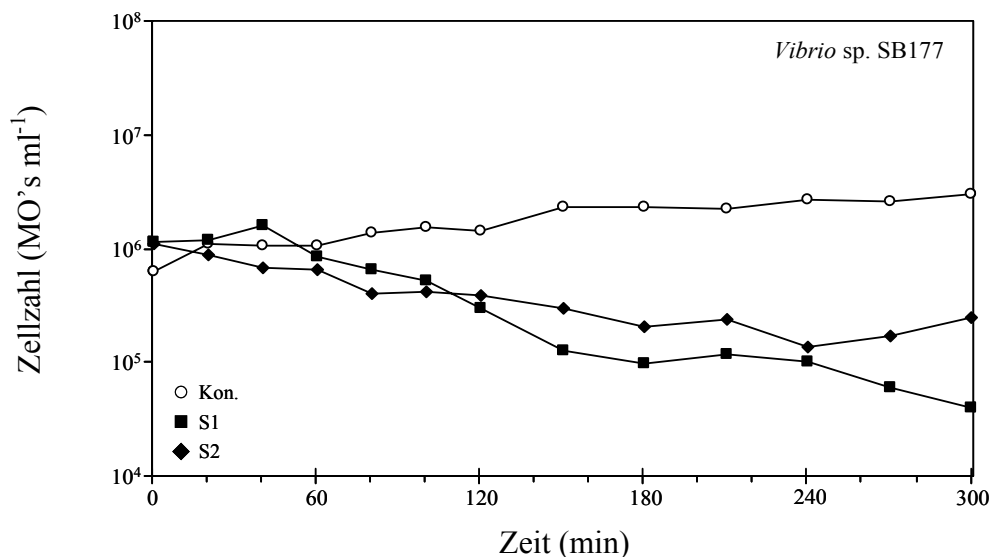


Abb. 4.2.11: Filtration von *Vibrio* sp. SB177 durch *T. aurantium*.

In weiteren Experimenten wurde die Aufnahme von  $\alpha$ -Proteobakterium SB89 getestet (Anhang A4). Auch für dieses Isolat wurde eine effiziente Aufnahme, verglichen mit der Kontrolle, beobachtet. Die durchschnittliche Filtrationsrate ( $n = 2$ ) betrug  $r = 1,10 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ .

#### 4.2.2.2 Filtration von bakteriellen Konsortien

Es wurde die Aufnahme von Schwammsymbionten durch *T. aurantium* untersucht. Für die Experimente wurden Präparationen des Symbiontenkonsortiums aus *A. aerophoba* verwendet (Abb. 4.2.12). Es wurde eine starke Reduktion der Zellzahl beobachtet, die durchschnittliche Filtrationsrate ( $n = 2$ ) betrug  $r = 6,94 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  (Anhang A4).

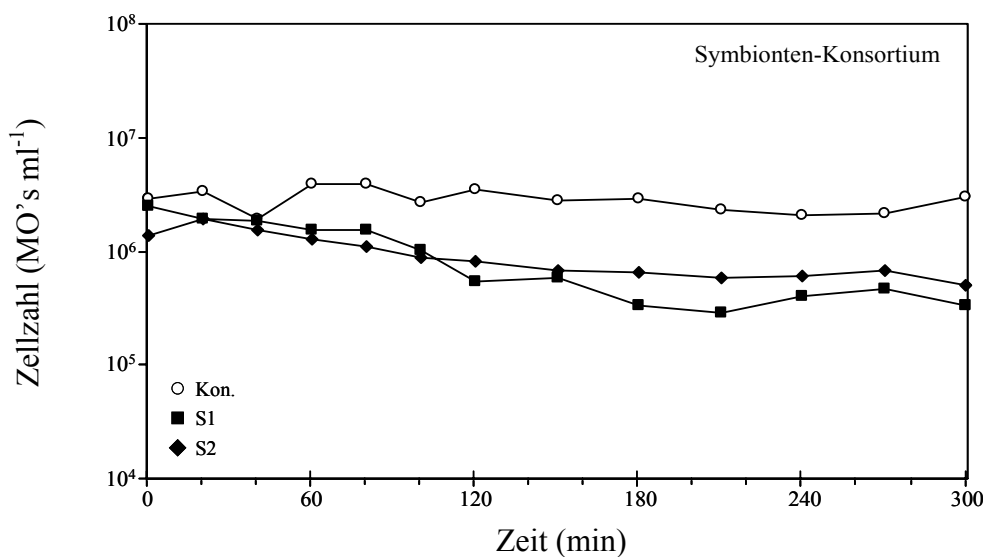


Abb. 4.2.12: Filtration von Schwammsymbionten durch *T. aurantium*.

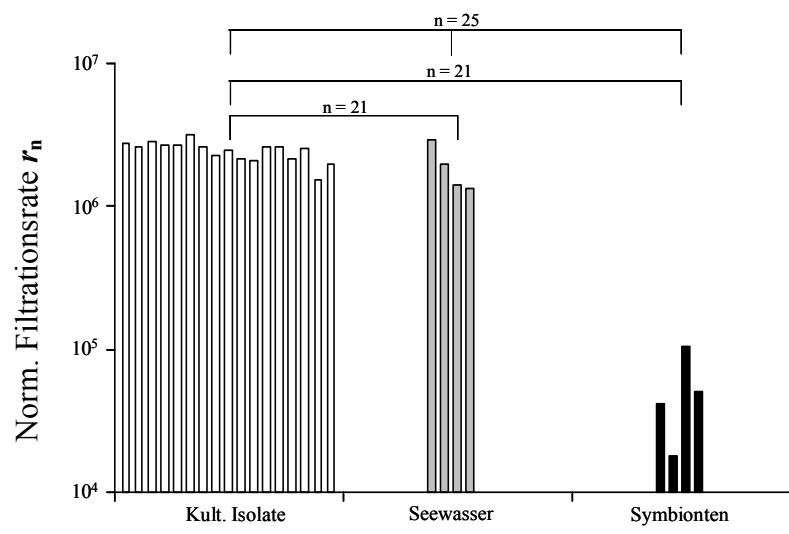
Darüber hinaus wurde das bakterielle Seewasserkonsortium getestet (Anhang A4). Auch hier wurde eine starke Reduktion der Zellzahl gemessen. Die berechnete durchschnittliche ( $n = 2$ ) Filtrationsrate betrug  $r = 1,83 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ .



### 4.2.3 Statistische Beurteilung der Filtrationsraten

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS. Wenn nicht anders beschrieben, wurde ein exakter Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die Signifikanz wurde anhand des Wahrscheinlichkeitswerts  $p$  der exakten, 2-seitigen Verteilung beurteilt.

***Aplysina aerophoba*:** Es wurden die normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  der kultivierbaren Bakterien (*Vibrio* sp. SB177,  $\alpha$ -Proteobakterium SB89, *Bacillus* sp. SB144, *Pseudoalteromonas* sp. SB200, *Pirellula* sp. SB81 und *Pirellula marina* DSM 3645) in einer Gruppe ( $n = 17$ ) zusammengefasst. Diese Gruppe wurde mit den Gruppen der Seewasserbakterien ( $n = 4$ ) und der Schwammsymbionten ( $n = 4$ ) verglichen (Abb. 4.2.13). Es wurde ein Kruskal-Wallis-H-Test verwendet. Die exakte Signifikanz lag bei  $p_{n=25; \alpha=0,05} = 0,00046$ , die Gruppen unterschieden sich mit deutlicher Signifikanz.



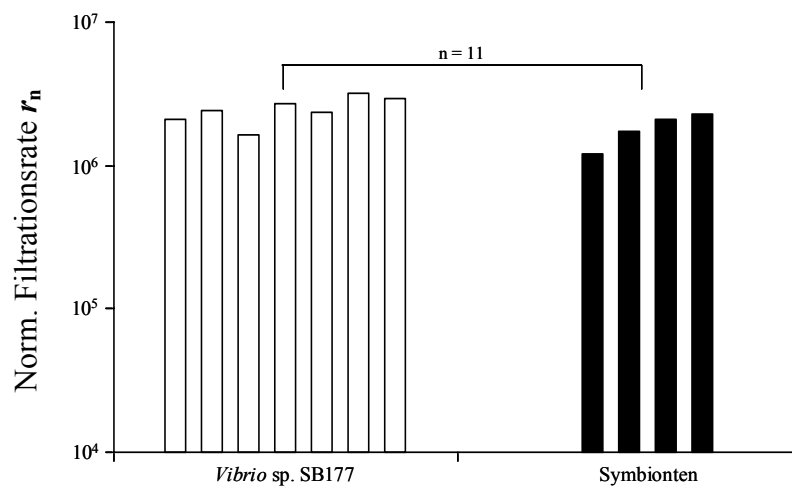
**Abb. 4.2.13:** *A. aerophoba*: Grafische Auftragung der normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  (Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ ) für kultivierbare Isolate (weiße Säulen), das Seewasserkonsortium (graue Säulen) und das Symbiontenkonsortium (schwarze Säulen). Die Überklammerung, mit Angabe der Stichprobenanzahl, kennzeichnet die jeweils miteinander analysierten Datensätze.

Nachfolgend wurden die drei Gruppen jeweils paarweise mit dem U-Test untersucht, dazu wurde  $\alpha$  nach Bonferroni adjustiert. Der Vergleich der Gruppe der kultivierbaren Bakterien mit der Gruppe der Seewasserbakterien ergab  $p_{n=21; \alpha=0,025} = 0,14403$ . Unterschiede beider Gruppen sind nicht signifikant. Ebenso wurde die Gruppe der kultivierbaren Bakterien mit der

Gruppe der Schwammsymbionten verglichen, es wurde  $p_n = 21; \alpha = 0,025 = 0,00033$  erhalten, die stark verminderte Filtration der Symbionten ist folglich signifikant unterschiedlich.

***Chondrosia reniformis***: Die Experimente an *Vibrio* sp. SB177 ( $n = 2$ ) und Schwammsymbionten ( $n = 2$ ) lassen keine statistische Beurteilung zu. Die ermittelten Daten sind jedoch konform zu den signifikanten Ergebnissen von *A. aerophoba*, mit einer hohen Aufnahme von *Vibrio* sp. SB177 und einer stark reduzierten Aufnahme von Symbionten.

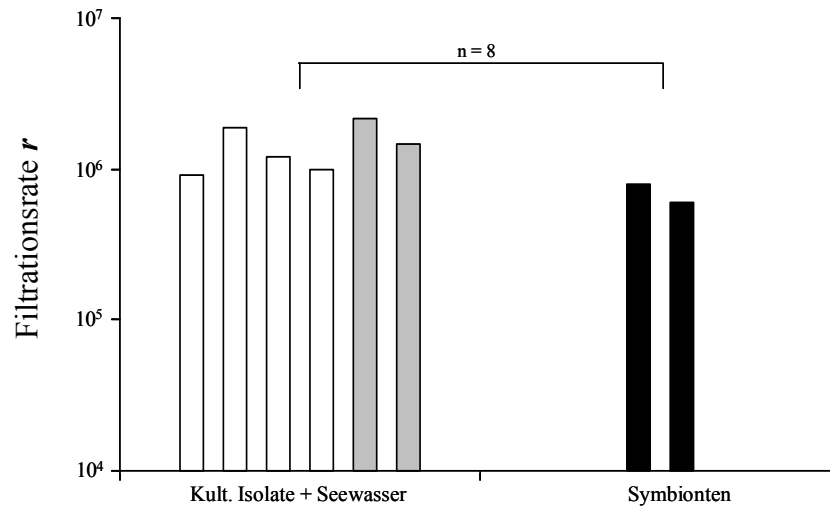
***Dysidea avara***: Es wurden die Werte der normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  für *Vibrio* sp. SB177 ( $n = 7$ ) und für Schwammsymbionten ( $n = 4$ ) verglichen (Abb. 4.2.14). Der U-Test ergab  $p_n = 11; \alpha = 0,05 = 0,10909$ , Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind nicht signifikant.



**Abb. 4.2.14:** *D. avara*: Grafische Auftragung der normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  (Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ ) für *Vibrio* sp. SB177 (weiße Säulen) und das Symbiontenkonsortium (schwarze Säulen). Die Überklammerung, mit Angabe der Stichprobenanzahl, kennzeichnet die untersuchten Datensätze.

***Tethya aurantium***: Die Datensätze mit *Vibrio* sp. SB177 ( $n = 2$ ),  $\alpha$ -Proteobakterium SB89 ( $n = 2$ ), Seewasserbakterien ( $n = 2$ ) und Symbionten ( $n = 2$ ) erlauben keine einzelne statistische Beurteilung. Um eine statistische Aussage darüber zu treffen, ob Symbionten differenziert aufgenommen werden, wurden die Daten für *Vibrio* sp. SB177,  $\alpha$ -Proteobakterium SB89 und für das Seewasserkonsortium zu einer Gruppe vereint und mit

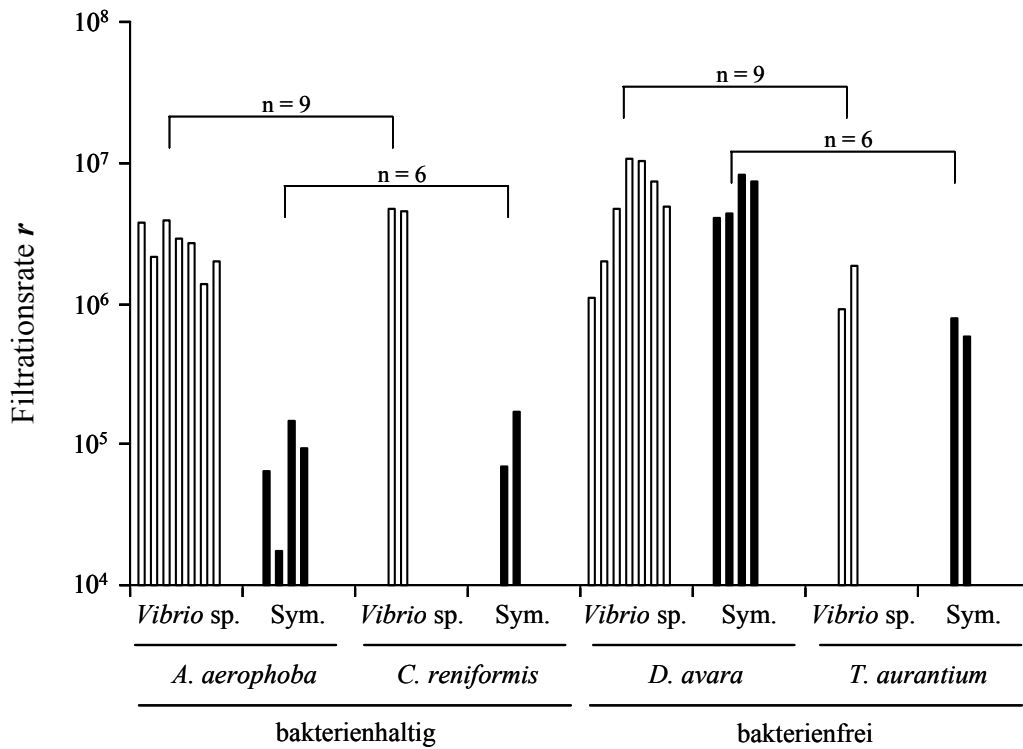
der Gruppe der Symbionten verglichen (Abb. 4.2.15). In diesem Fall lieferte der U-Test  $p_n = 8; \alpha = 0,05 = 0,07143$ . Damit liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede für beide Gruppen vor.



**Abb. 4.2.15:** *T. aurantium*: Grafische Auftragung der Filtrationsraten  $r$  (Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ ) für kultivierbare Isolate (weiße Säulen) zusammen mit dem Seewasserkonsortium (graue Säulen) und für das Symbiontenkonsortium (schwarze Säulen). Die Überklammerung, mit Angabe der Stichprobenanzahl, kennzeichnet die beiden verglichenen Datensätze.

**Bakterienhaltige und bakterienarme Schwämme:** *A. aerophoba* und *C. reniformis* wurden aufgrund vorhergehender elektronenmikroskopischer Untersuchungen in einer Gruppe der bakterienhaltigen Schwämme zusammengefasst. Parallel dazu wurden *D. avara* und *T. aurantium* als bakterienarme Schwämme zusammen gruppiert. Die Filtrationsraten  $r$  für Schwammsymbionten und *Vibrio* sp. SB177 beider Gruppen wurden getestet. Zum Vergleich aller vier Gruppen, dargestellt in Abbildung 4.2.16, wurde der Kruskal-Wallis-H-Test verwendet. Da SPSS für diese Datenmenge keinen exakten Test mehr durchführt, wurde eine Monte-Carlo-Simulation mit  $1 \times 10^6$  Berechnungen verwendet, die Signifikanz lag bei  $p_n = 30; \alpha = 0,05 = 0,000597$ , bei einem Konfidenzniveau von 99 % lag die Obergrenze bei  $p = 0,00066$ , die Untergrenze bei  $p = 0,00053$ . Somit unterscheiden sich die verglichenen Gruppen mit deutlicher Signifikanz. Nachfolgend wurden die Gruppen paarweise getestet. Die  $r$ -Werte der beiden Gruppen (*Vibrio* sp. SB177 und Symbionten) der bakterienhaltigen Schwämme wurden mit dem U-Test exakt analysiert. Es wurde  $p_n = 15; \alpha = 0,05 = 0,00067$  erhalten. Bei bakterienhaltigen Schwämmen ist die reduzierte Filtrationseffizienz gegenüber

Symbionten somit statistisch signifikant. Auf gleiche Art wurden die beiden Gruppen der bakterienfreien Schwämme analysiert. Im U-Test wurde hier  $p_{n=15; \alpha=0,05} = 0,52867$  erhalten, die Unterschiede der Filtrationsraten sind statistisch nicht signifikant.



**Abb. 4.2.16:** Grafische Auftragung der Filtrationsraten  $r$  (Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ ) aller getesteter Schwammspezies für *Vibrio sp.* SB177 (weiße Säulen) und das Schwamm-symbiontenkonsortium (Sym., schwarze Säulen). Die Überklammerung, mit Angabe der Stichprobenanzahl, kennzeichnet hier die Zusammenfassung von Datensätzen in vier Gruppen für die statistische Auswertung.

### 4.3 Allometrie mariner Schwämme

Mit dem Begriff Allometrie werden in biologischen Systemen Unproportionalitäten von physiologischen Leistungen zu Größenparametern, wie z. B. der Masse, bezeichnet. Die in Kap. 4.2 ermittelten Filtrationsraten verschieden großer Individuen deuteten auf eine allometrische Beziehung zwischen Körpermasse der Schwämme und bakterieller Filtrationsleistung hin.

#### 4.3.1 Allometrie bei *Aplysina aerophoba*

Anhand von sieben unterschiedlich großen Individuen wurde die Allometrie der bakteriellen Filtrationsleistung bei *A. aerophoba* untersucht. In Filtrationsexperimenten wurde die Aufnahme von *Vibrio* sp. SB177 gemessen (Abb. 4.3.1). Die Masse der untersuchten Schwämme variierte zwischen 48 – 143 g. Dieser Größenbereich repräsentierte die in den Experimenten verwendeten und an den Untersuchungsstandorten gefundenen Individuengrößen. Die Kurvenschar zeigt, verglichen mit den Kontrollen, für alle untersuchten Tiere nach 300 min eine durchschnittliche Reduktion der bakteriellen Zellkonzentration von  $\sim 3$  log-Stufen, Trotz stark unterschiedlicher Schwammmassen unterscheiden sich die Kurvensteigungen in den zur Berechnung verwendeten 100 min Intervallen nicht.

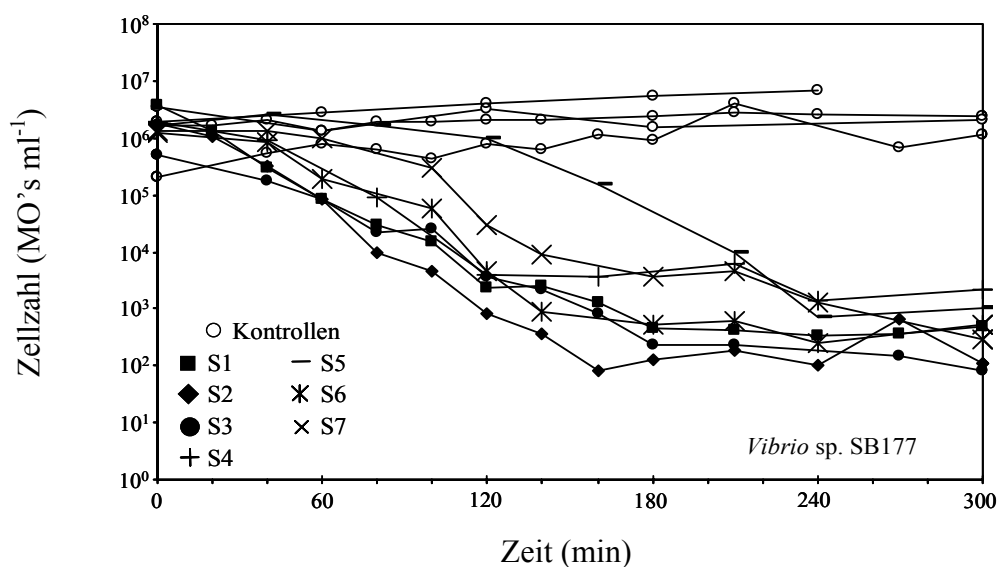


Abb. 4.3.1: Filtration von *Vibrio* sp. SB177 durch *A. aerophoba*-Individuen unterschiedlicher Größe.

Die aus den Kurven errechneten Werte der aufgenommenen Bakterien Schwamm<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, die Filtrationsraten  $r$  und weitere Untersuchungsdaten sind in Tabelle 4.3.1 zusammengefasst.

**Tab. 4.3.1:** Filtrationsexperimente an sieben *A. aerophoba*-Individuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	$r^2$ der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate $r$
1	50	9,6	40-140	0,9635	1,89 x 10 <sup>8</sup>	3,78 x 10 <sup>6</sup>
2	90	17	40-140	0,9841	1,96 x 10 <sup>8</sup>	2,18 x 10 <sup>6</sup>
3	48	9,2	60-160	0,9530	1,89 x 10 <sup>8</sup>	3,94 x 10 <sup>6</sup>
4	68	13	40-120	0,9933	1,98 x 10 <sup>8</sup>	2,91 x 10 <sup>6</sup>
5	75	14	120-240	0,9928	1,99 x 10 <sup>8</sup>	2,65 x 10 <sup>6</sup>
6	143	27	60-150	0,9809	1,96 x 10 <sup>8</sup>	1,37 x 10 <sup>6</sup>
7	99	19	60-150	0,9819	1,94 x 10 <sup>8</sup>	1,96 x 10 <sup>6</sup>

$r$ : aufgenommene MO's g<sup>-1</sup> Schwamm (Nassmasse) h<sup>-1</sup>

Wird die Anzahl der aufgenommenen Bakterien Schwamm<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> über die Schwammmasse in einem Diagramm aufgetragen, (Abb. 4.3.2a), wird deutlich, dass keine Abhängigkeit von der Schwammmasse besteht. Zur Beschreibung solcher physiologischer Zusammenhänge wird in der Literatur eine potenzielle Funktion vom Typ  $f(x) = a \cdot x^b$  verwendet. Dabei ist  $b$  der allometrische Exponent, der bei Isometrie (exakter Proportionalität) gleicher Dimensionen den Wert  $b = 1$  annimmt und bei Allometrie  $b \neq 1$  ist. Unter Anwendung dieses Funktionstyps wurde für die vorliegenden Daten folgende Gleichung erhalten:

$$y = 1,691 \times 10^8 \cdot m_f^{0,0321} \quad r^2 = 0,3644$$

$y$ : aufgenommene Bakterienzellen Schwamm<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>  
 $m_f$ : g Nassmasse

Der ermittelte sehr kleine  $b$ -Wert beschreibt folglich eine starke Allometrie, die wegen  $b < 1$  als negative Allometrie bezeichnet wird. Eine mathematisch genauere Beschreibung der Daten, mit besserem Bestimmtheitsmaß, erfolgt durch die in Abb. 4.3.2a eingezeichnete Funktion:

$$y = 1,970 \times 10^8 \cdot (1 - e^{-0,0677 m_f}) \quad r^2 = 0,7075$$

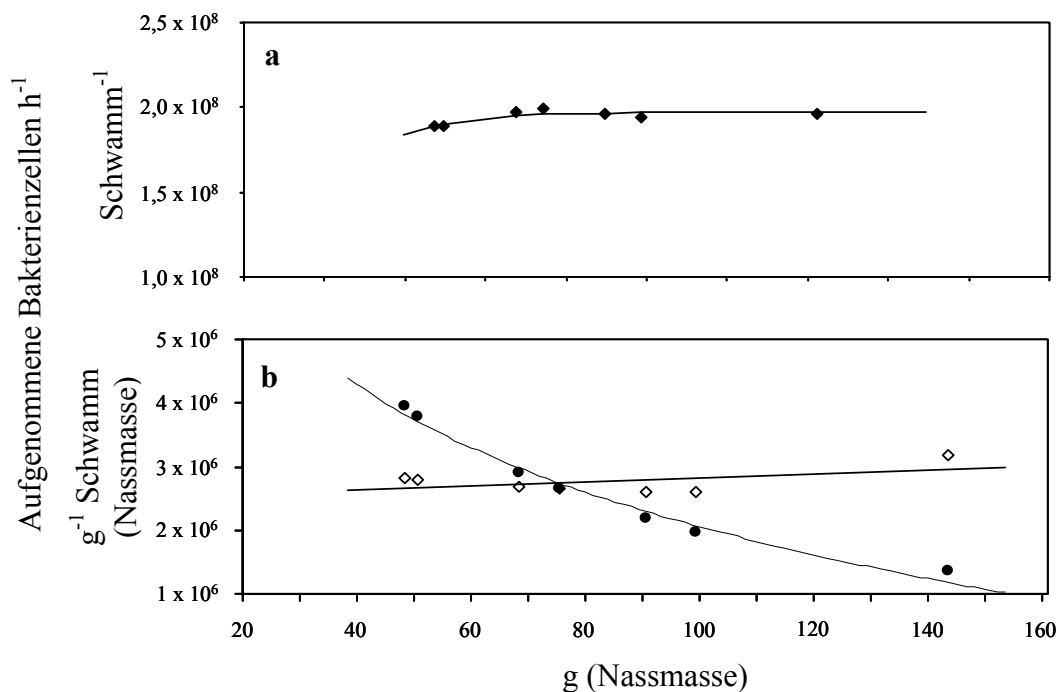
Da die Filtrationsrate  $r$  der Quotient aus aufgenommenen Bakterien Schwamm<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und der Schwammmasse ist, ergibt sich eine reziproke Korrelation zur Schwammmasse (Abb. 4.3.2b, geschlossene Kreise). Es wurde folgende Funktion für die Filtrationsrate  $r$  ermittelt:

$$r = -2,417 \times 10^6 \cdot \ln(m_f) + 1,318 \times 10^7 \quad r^2 = 0,9824$$

$r$ : Anzahl der aufgenommenen Bakterienzellen g<sup>-1</sup> Schwamm (Nassmasse) h<sup>-1</sup>

$m_f$ : g Nassmasse

Sie gibt die Abhängigkeit der Filtrationsrate  $r$  von der Schwammmasse (g Nassmasse) an. Mit Hilfe dieser Funktion konnten alle Werte der Filtrationsrate  $r$  für den Einfluss der unterschiedlichen Schwammmassen korrigiert werden. Dabei wurde auf 1 g eines ideellen „Prototyp“-Schwamms von 75 g (Nassmasse) normalisiert. Die so erhaltenen Datenwerte wurden als normalisierte Filtrationsraten  $r_n$  bezeichnet (Abb. 4.3.2b, offene Rauten), die Dimension lautet: aufgenommene Bakterien g<sup>-1</sup> Schwamm (Nassmasse, normalisiert für eine „Prototyp“-Schwammmasse von 75 g) h<sup>-1</sup>.



**Abb. 4.3.2a, b:** Quantifizierung der bakteriellen Filtration in Bezug auf die Schwammmasse bei *A. aerophoba*. **a:** Anzahl der aufgenommenen Zellen Schwamm<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> aufgetragen über die Schwammmasse, **b:** Filtrationsrate  $r$  (gefüllte Kreise) und normalisierte Filtrationsrate  $r_n$  (offene Rauten) aufgetragen über die Schwammmasse. Für die korrigierte Filtrationsrate  $r_n$  wurde auf 1 g eines „Prototyp“-Schwamms von 75 g normalisiert.

Ferner wurde eine Normalisierung auf die Trockenmasse vorgenommen. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen Nass- und Trockenmasse wurden 153 Gewebeproben untersucht. Es wurde folgende Funktion ermittelt:

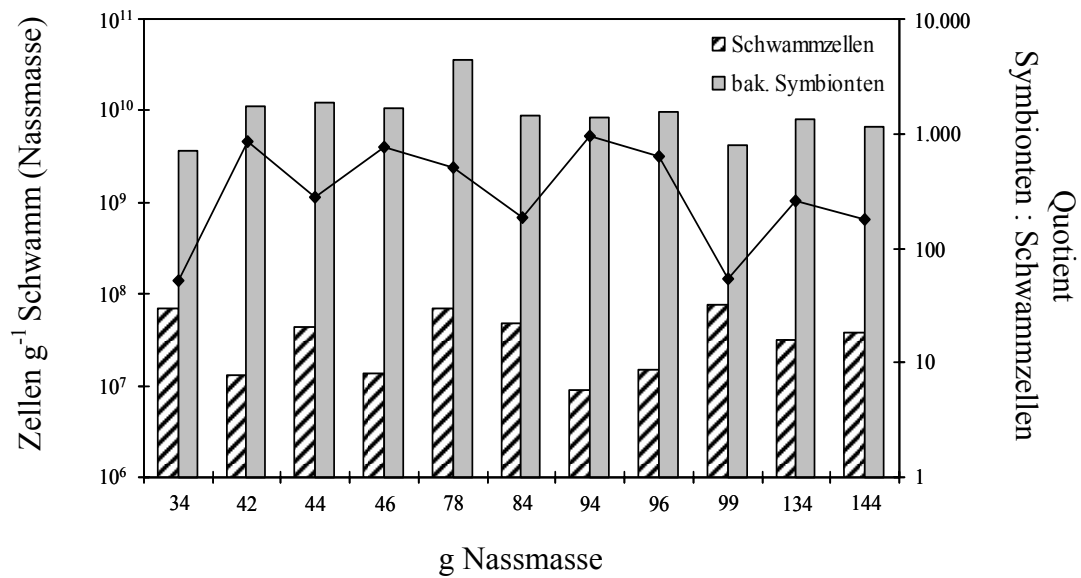
$$m_t = 0,1915 m_f \quad r^2 = 0,9018$$

$m_t$ : g Trockenmasse  
 $m_f$ : g Nassmasse

Mit Hilfe dieser Funktion konnten die Werte für die normalisierte Filtrationsrate  $r_n$  auf eine Trockenmasse von 1 g umgerechnet werden, diese wurde als normalisierte Filtrationsrate für Trockenmasse  $r_{nt}$  bezeichnet. Die  $r_{nt}$ -Werte für Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* sind in Anhang A1 aufgeführt.

**Untersuchung der zellulären Gewebezusammensetzung.** Da an der Allometrie beteiligte Mechanismen und Faktoren bislang unbekannt sind, wurde die Gewebezusammensetzung verschieden großer *A. aerophoba*-Individuen untersucht. Dazu wurde die Anzahl der Schwammzellen und der bakteriellen Symbionten quantifiziert. Die Untersuchung wurde an 11 Individuen mit Nassmassen von 33,9 - 144 g durchgeführt. Es wurde jeweils eine Gewebeprobe von 1 g entnommen, durch repetitive Gewebedissoziation wurden die Zellen quantitativ freigesetzt. In der erhaltenen Zellsuspension wurde die Anzahl der Schwammzellen und der bakteriellen Symbionten nach DAPI-Anfärbung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3.3 zusammengefasst. Für die untersuchten 11 Individuen wurde eine Variation der Schwammzellkonzentration von  $8,90 \times 10^6$  bis  $7,60 \times 10^7$  Zellen  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse) ermittelt, diese Maximal- und Minimalwerte wurden an annähernd gleichgroßen Individuen (94 g und 99 g) gemessen. Im Mittel ( $n = 11$ ) ergab sich eine Konzentration von  $3,89 \pm 2,52 \times 10^7$  Schwammzellen  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse). Ebenso wurde eine Variation um etwa 1 log-Stufe für die Konzentration der bakteriellen Symbionten gefunden. Das Maximum mit  $3,59 \times 10^{10}$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse) wurde für ein 78 g schweres Individuum ermittelt, während der Minimalwert von  $3,71 \times 10^9$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse) bei einem 34 g schweren Individuum gemessen wurde, der Durchschnitt ( $n = 11$ ) betrug  $1,08 \pm 0,87 \times 10^{10}$  Symbionten  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse).





**Abb. 4.3.3:** Konzentration von Schwammzellen und bakteriellen Symbionten in unterschiedlich großen *A. aerophoba*-Individuen (Säulen), sowie deren Verhältnis zueinander (Rautensymbole).

Für den Quotienten der Zellzahlen (bakterielle Symbionten : Schwammzellen) ergaben sich Werte von 52,2 – 958 für Schwämme mit den Massen von 34 g und 94 g, der Durchschnitt lag bei  $429 \pm 327$ . Für die untersuchten 11 Individuen konnten keine signifikante Korrelationen zwischen Schwammmasse und Zellzahlen erkannt werden, die Werte für den Pearson'schen Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 4.3.2 zusammengefasst:

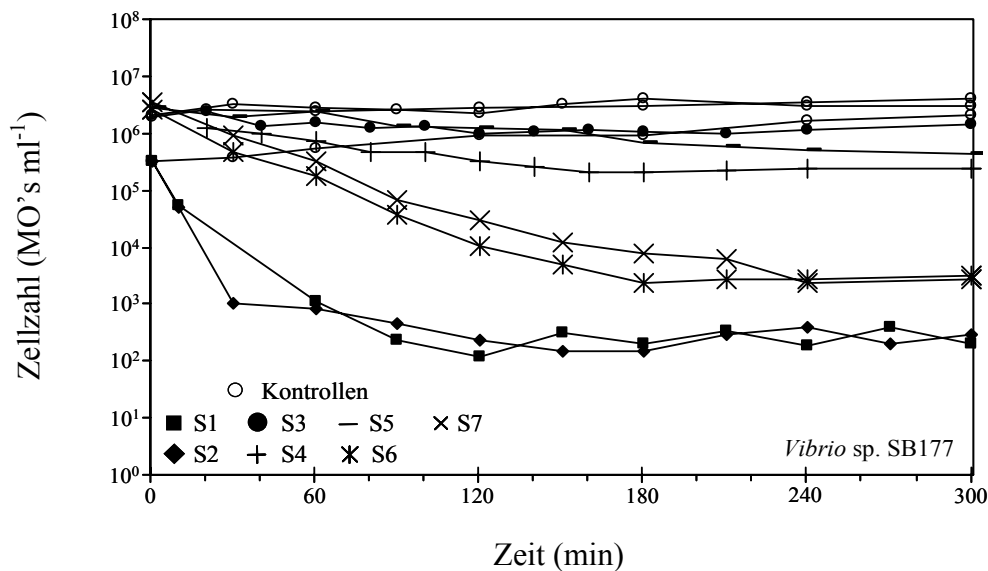
**Tabelle 4.3.2:** Korrelation von Schwammmasse und Zellzahlen.

Schwammmasse zu:	Pearson'scher Korrelationskoeffizient
Schwammzellen	-0,0373
Bakterielle Symbionten	-0,1153
Ratio (Symbionten : Schwammzellen)	-0,2327

Die Testschranke für  $n = 11$ ;  $v = n - 2$  und einem Konfidenzniveau von 95 % liegt bei 0,6021.

### 4.3.2 Allometrie bei *Dysidea avara*

Bei Filtrationsexperimenten mit dem bakterienarmen Schwamm *D. avara* wurde beobachtet, dass auch diese Spezies keine strenge Korrelation von bakterieller Filtrationsleistung und Körpermasse aufwies. Die getesteten sieben Individuen hatten Massen von 11,7 – 180 g und repräsentierten die Größe der im Habitat gefundenen Exemplare. Durch Filtrationsexperimente wurde die Aufnahme von *Vibrio* sp. SB177 getestet (Abb. 4.3.4). Die ermittelten Kurven waren, abhängig von der Schwammmasse, heterogen verteilt. Tabelle 4.3.3 fasst die Untersuchungsdaten der jeweiligen Schwammindividuen zusammen.



**Abb. 4.3.4:** Filtration von *Vibrio* sp. SB177 durch *D. avara*-Individuen unterschiedlicher Größe.

**Tab. 4.3.3:** Untersuchung der Allometrie an sieben *D. avara*-Individuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	$r^2$ der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate $r$
1	180	14	0-90	0,9750	$1,99 \times 10^8$	$1,10 \times 10^6$
2	100	7,9	0-90	0,7469	$1,98 \times 10^8$	$1,98 \times 10^6$
3	18	1,4	20-120	0,7425	$8,42 \times 10^7$	$4,73 \times 10^6$
4	12	0,9	20-120	0,9762	$1,23 \times 10^8$	$1,05 \times 10^7$
5	10	0,8	60-180	0,8722	$1,03 \times 10^8$	$1,03 \times 10^7$
6	25	2,0	0-120	0,9906	$1,82 \times 10^8$	$7,27 \times 10^6$
7	38	3,0	0-120	0,9934	$1,86 \times 10^8$	$4,91 \times 10^6$

$r$ : aufgenommene MO's g<sup>-1</sup> Schwamm (Nassmasse) h<sup>-1</sup>

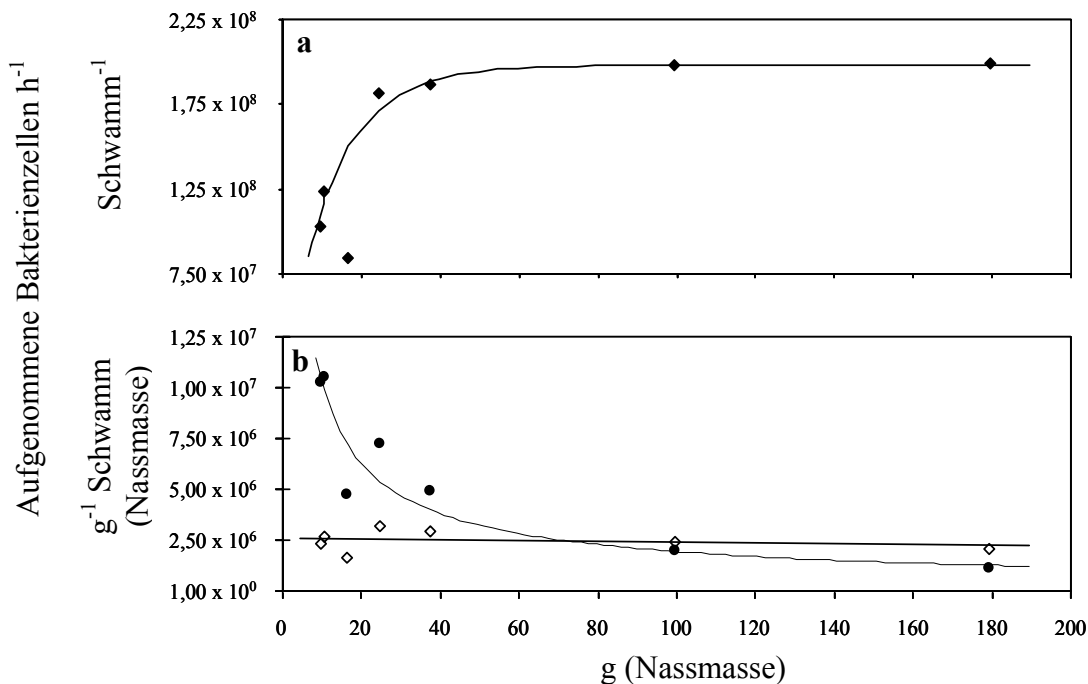
Die Werte für die Anzahl der aufgenommenen Bakterien  $\text{Schwamm}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurden in einem Diagramm über der Körpermasse aufgetragen (Abb. 4.3.5a). Die Datenpunkte zeigten eine Zunahme bei steigender Schwammmasse bis etwa 20 g, für höhere Massen war eine Sättigung erkennbar. Die allgemeine Allometriefunktion lautet:

$$y = 6,188 \times 10^7 \cdot m_f^{0,2487} \quad r^2 = 0,5973$$

$y$ : aufgenommene Bakterienzellen  $\text{Schwamm}^{-1} \text{ h}^{-1}$   
 $m_f$ : g Nassmasse

Da  $b < 1$ , liegt eine negative Allometrie zw. Schwammmasse und bakterieller Aufnahme vor. Eine mathematisch exaktere Beschreibung der Daten liefert die in Abb. 4.3.5a eingezeichnete Funktion:

$$y = 1,980 \times 10^8 \cdot (1 - e^{-0,0804 m_f}) \quad r^2 = 0,7258511$$



**Abb. 4.3.5a, b:** Quantifizierung der bakteriellen Filtration in Bezug auf die Schwammmasse bei *D. avara*. **a:** Anzahl der aufgenommenen Bakterien  $\text{Schwamm}^{-1} \text{ h}^{-1}$  aufgetragen über die Schwammmasse, **b:** Filtrationsrate  $r$  (gefüllte Kreise) und normalisierte Filtrationsrate  $r_n$  (offene Rauten) aufgetragen über die Schwammmasse. Für die korrigierte Filtrationsrate  $r_n$  wurde auf 1 g eines „Prototyp“-Schwamms von 75 g normalisiert.

Beim Auftragen der Filtrationsraten  $r$  (Abb. 4.3.5b, gefüllte Kreise), ergaben sich abnehmende Werte über die Schwammmasse. Für die Datenpunkte wurde folgende Regressionsgerade ermittelt:

$$r = 5,828 \times 10^7 \cdot m_f^{-0,7384} \quad r^2 = 0,9229$$

$r$ : Anzahl der aufgenommenen Bakterienzellen  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse)  $h^{-1}$   
 $m_f$ : g Nassmasse

Mit Hilfe dieser Regressionsgeraden wurden die Werte der Filtrationrate  $r$  für den Einfluss der unterschiedlichen Massen der Individuen normalisiert. Die Normalisierung bezieht sich auf 1 g Schwammgewebe eines ideellen „Prototyp“-Schwamms mit 75 g Nassmasse.

Um die Filtrationsraten auf Schwammtrockenmasse zu normalisieren, wurde die Korrelation von Nass- zu Trockenmasse der Schwämme bestimmt. Es wurde folgende Funktion ermittelt ( $n = 9$ ):

$$m_t = 0,0790m_f \quad r^2 = 0,9169$$

$m_t$ : g Trockenmasse  
 $m_f$ : g Nassmasse

Anhand dieser Funktion konnten die normalisierten Filtrationsraten  $r_n$  auf eine Trockenmasse von 1 g normalisiert werden, es wurde die normalisierte Filtrationsrate für Trockenmasse  $r_{nt}$  erhalten. Die  $r_{nt}$ -Werte für die Filtrationsexperimente von *D. avara* sind in Anhang A3 genannt.

## 4.4 Selektivität der bakteriellen Filtration

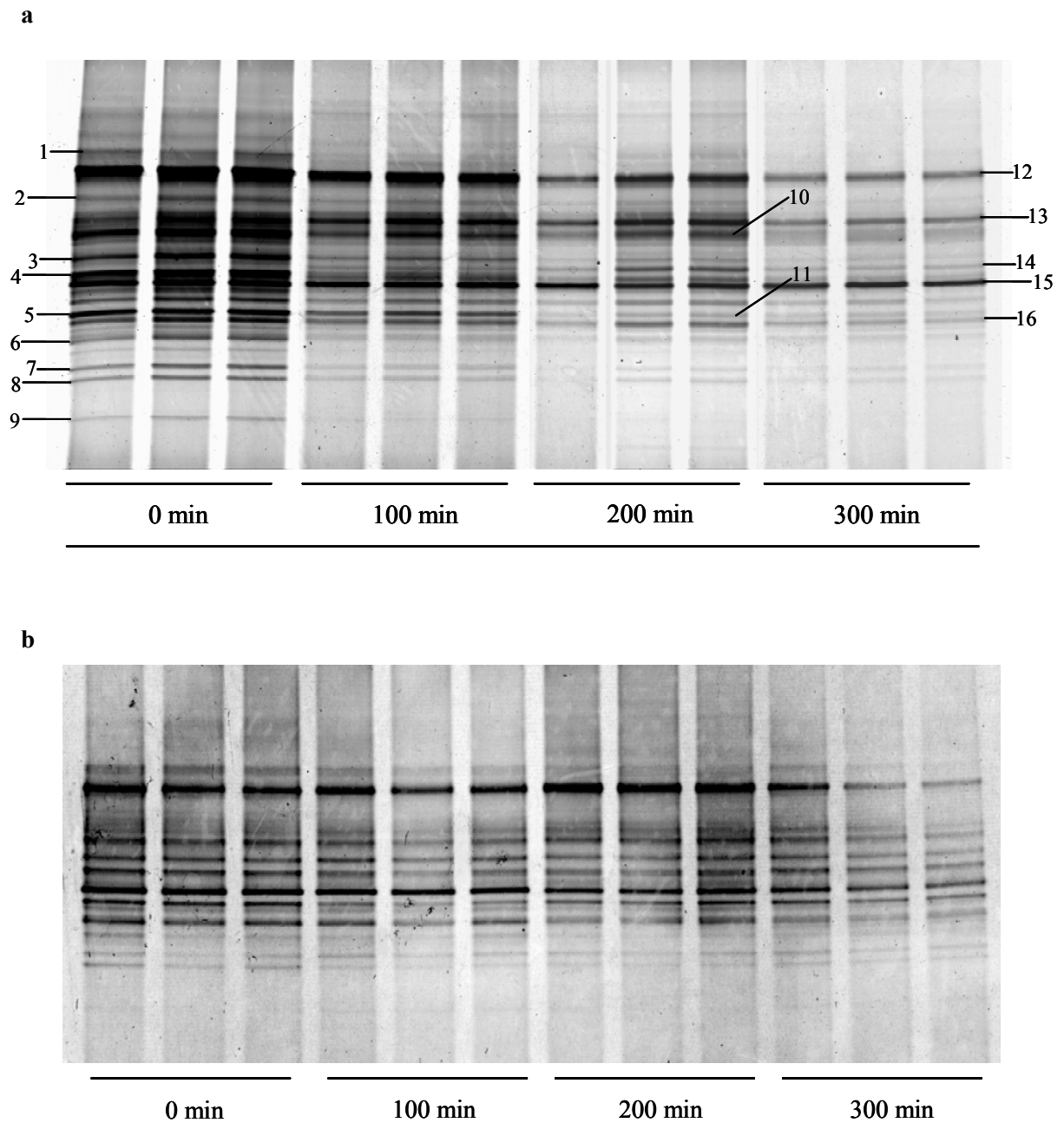
Sowohl bakterienhaltige als auch bakterienarme Schwämme nehmen mit hoher Effizienz kultivierbare bakterielle Isolate und das bakterielle Seewasserkonsortium auf. Bakterienhaltige Schwämme, wie der untersuchte *A. aerophoba* und *C. reniformis*, zeigen jedoch eine stark reduzierte Aufnahme für das Konsortium der Schwammsymbionten. In weiterführenden Experimenten wurde untersucht, ob eine Selektivität für bestimmte phylogenetische Gruppen innerhalb der Konsortien vorlag. Zur Analyse der phylogenetischen Zusammensetzung von Konsortien wurde die Methode der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) angewendet.

### 4.4.1 Phylogenetische Veränderung von Seewasserkonsortien

*Aplysina aerophoba* vermochte das Konsortium der Seewasserbakterien mit hoher Effizienz aufzunehmen. Die phylogenetische Zusammensetzung des Konsortiums während der Filtrationsexperimente ( $n = 2$ ) wurde mittels DGGE analysiert, dazu wurden zu den Zeitpunkten 0, 100, 200 und 300 min Proben entnommen. Parallel wurden die Zellzahlen durch DAPI-Auszählung bestimmt (Diagramme nicht dargestellt). Die Filtrationsraten wurden über das 300 min Zeitintervall bestimmt und ergaben durchschnittlich  $r_n = 2,37 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ . Dieser Wert übersteigt den in den Filtrationsversuchen (Kap. 4.2) exakt bestimmten Wert ( $r_n = 1,90 \pm 0,73 \times 10^6$ ) und belegt, dass eine bakterielle Aufnahme stattgefunden hatte. Die expliziten Daten sind in Anhang A6 zusammengefasst. Für die phylogenetische Analyse mittels DGGE wurde ein Fragment der 16S rDNA durch PCR amplifiziert. In Vorversuchen war zunächst untersucht worden, welche phylogenetische Auflösung mit verschiedenen 16S rDNA-Fragmenten erhalten werden konnte. Die ~230 bp langen Fragmente des Primerpaars 341f GC / 534r ergaben eine um mindestens 25 % höhere Bandenzahl verglichen zu den ~620 bp langen Produkten des Primerpaars 341f GC / 907r. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Experimente das Primerpaar 341f GC / 534r verwendet. Da bei DGGE-Analysen eine relativ große Menge DNA aufgetragen werden muss, wurden 35 PCR-Zyklen zur Amplifikation benutzt. Für jede Probe wurden drei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt, um mögliche Artefakte und Kontaminationen erkennen zu können. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Gele nicht gezeigt). Die PCR-Produkte wiesen die errechnete

Länge von ~230 bp auf, sodass von einer spezifischen Reaktion ausgegangen wurde. Für die DGGE-Gele wurden denaturierende Gradienten von 0 - 90 % verwendet, die Elektrophorese erfolgte unter Standardbedingungen (60°C, 150V, 6 h). Zur bildgebenden Auswertung aller DGGE-Gele wurde die hochsensitive DNA-Färbung mit SYBR-Farbstoffen und anschließendem Laserscan durchgeführt. Das Gel für Schwammindividuum 2 ist in Abbildung 4.4.1a dargestellt, das DGGE-Gel von Individuum 1 ist aufgrund eines vergleichbaren Bandenmusters nicht dargestellt. Korrespondierend zur Zellzahlbestimmung durch DAPI war der DNA-Gehalt für den 0 min-Wert am höchsten und nahm über die Zeit bis zum 300 min-Wert ab. Innerhalb der drei Replikaproben eines Zeitpunktes waren leichte Unterschiede in der Bandenstärke erkennbar, die auf leichte methodische Variabilitäten hindeuteten.

Bei der Analyse des Gels wurden für den 0 min-Wert 40 Banden gezählt. Über die Zeit nahm die Anzahl der Banden ab und erreichte schließlich 19 beim 300 min-Wert. Die Banden wurden je nach ihrer Stärke über den zeitlichen Verlauf in drei Gruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte in konstante, reduzierte und verschwindende Banden. Repräsentative Vertreter aus jeder Gruppe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert (gekennzeichnet im Gelbild). Der Gruppe der verschwindenden Banden wurden 21 zugeordnet. Von diesen wurden 9 sequenziert (Bande 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10). Fast alle OTUs fielen in die Gruppe der *Gammaproteobacteria*, lediglich die Sequenz von Bande 10 fiel in die Gruppe *Chloroflexi*. In die Gruppe der reduzierten Banden fielen 18, von diesen wurden 6 sequenziert (Bande 5, 11, 12, 13, 14, 16). Alle Sequenzen dieser OTU's stammten aus der Gruppe der *Gammaproteobacteria*. In die Gruppe der konstanten Banden fiel nur Bande 15, deren Sequenz den *Alphaproteobacteria* zugeordnet werden konnte. Die Daten aus der Sequenzierung sind in Tabelle 4.4.1 zusammengefasst. Das DGGE-Gel des Kontrollexperiments ohne Schwamm ist in Abbildung 4.4.1b gezeigt. Konform mit der DAPI-Zellzahlbestimmung wurde ein fast konstanter DNA-Gehalt über alle Zeitpunkte gefunden. Bei genauer Analyse des Gels wurden 26 Banden nachgewiesen. Das Bandenmuster ist über alle Zeitpunkte konstant, es konnten keine verschwindenden oder reduzierten Banden gefunden werden. Die geringere Anzahl der Banden resultierte, bei gleichen denaturierenden Gradienten, aus einer extrem verkürzten Inkubationszeit des polymerisierten Gels. Dadurch war der denaturierende Gradient noch nicht gleichmäßig über das gesamte Gel verteilt.



**Abb. 4.4.1:** DGGE-Analyse der phylogenetischen Veränderungen des bakteriellen Seewasserkonsortiums durch Filtration von *A. aerophoba*. **a:** DGGE-Gel von Schwammindividuum 2 mit jeweils 3 Replikaproben je Zeitpunkt. Sequenzierte Banden sind gekennzeichnet. **b:** DGGE-Gel der Kontrolle.

**Tab. 4.4.1:** Sequenzierung der Banden des DGGE-Gels des bakteriellen Seewasserkonsortiums.

DGGE-Muster	DGGE-Bande	Methode	Homologie (%)	Länge (bp)	Nächster Verwandter mit GenBank-Nummer	Phylum
Verschwindend	1	kloniert	98	191 / 194	Unkult. <i>Gammaproteobacterium</i> CHAB-XII-8 (UGA240915.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	2	kloniert	99	193 / 194	<i>Vibrio</i> sp. GWS-TZ-H182 (AY332210.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	3	kloniert	96	138 / 143	Unkult. <i>Gammaproteobacterium</i> Klon SIMO-2862 (DQ189837.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	4	kloniert	99	193 / 194	Unkult. <i>Vibrio</i> sp. Klon VDP45 (AY702268.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	6	kloniert	95	187 / 195	Unkult. <i>Gammaproteobacterium</i> Klon BS1-0-40 (AY254915.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	7	kloniert	100	194 / 194	Unkult. <i>Gammaproteobacterium</i> Klon CHAB-B-29 (UGA240916)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	8	kloniert	93	130 / 139	<i>Salinomonas chungwhensis</i> Stamm BH030046 (AY553295.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	9	kloniert	98	191 / 194	<i>Neptunomonas</i> sp. SO18 (AY371422.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Verschwindend	10	kloniert	99	167 / 168	Unkult. <i>Aplysina aerophoba</i> -Klon TK32 (UBA347042.1)	<i>Chloroflexi</i>
Reduziert	5	kloniert	99	193 / 194	Unkult. <i>Vibrio</i> sp. Klon VTP28 (AY702299.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Reduziert	11	kloniert	98	191 / 194	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. QD1-2 (AY626830.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Reduziert	12	direkt	99	155 / 156	<i>Gammaproteobacterium</i> UST991130-006 (AF465394.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Reduziert	13	kloniert	97	160 / 164	<i>Alteromonadaceae</i> -Bakterium GWS-BW-H7M (AY515433.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Reduziert	14	kloniert	99	193 / 194	Unkult. <i>Vibrio</i> sp. Klon 14-131 (AY374381.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Reduziert	16	kloniert	100	177 / 177	<i>Vibrio</i> sp. Isolat SUB7 (AY780439.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Konstant	15	direkt	99	126 / 127	Unkult. <i>Rhodobacteriaceae</i> -Bakterium Klon DS162 (DQ234244.1)	<i>Alphaproteobacteria</i>



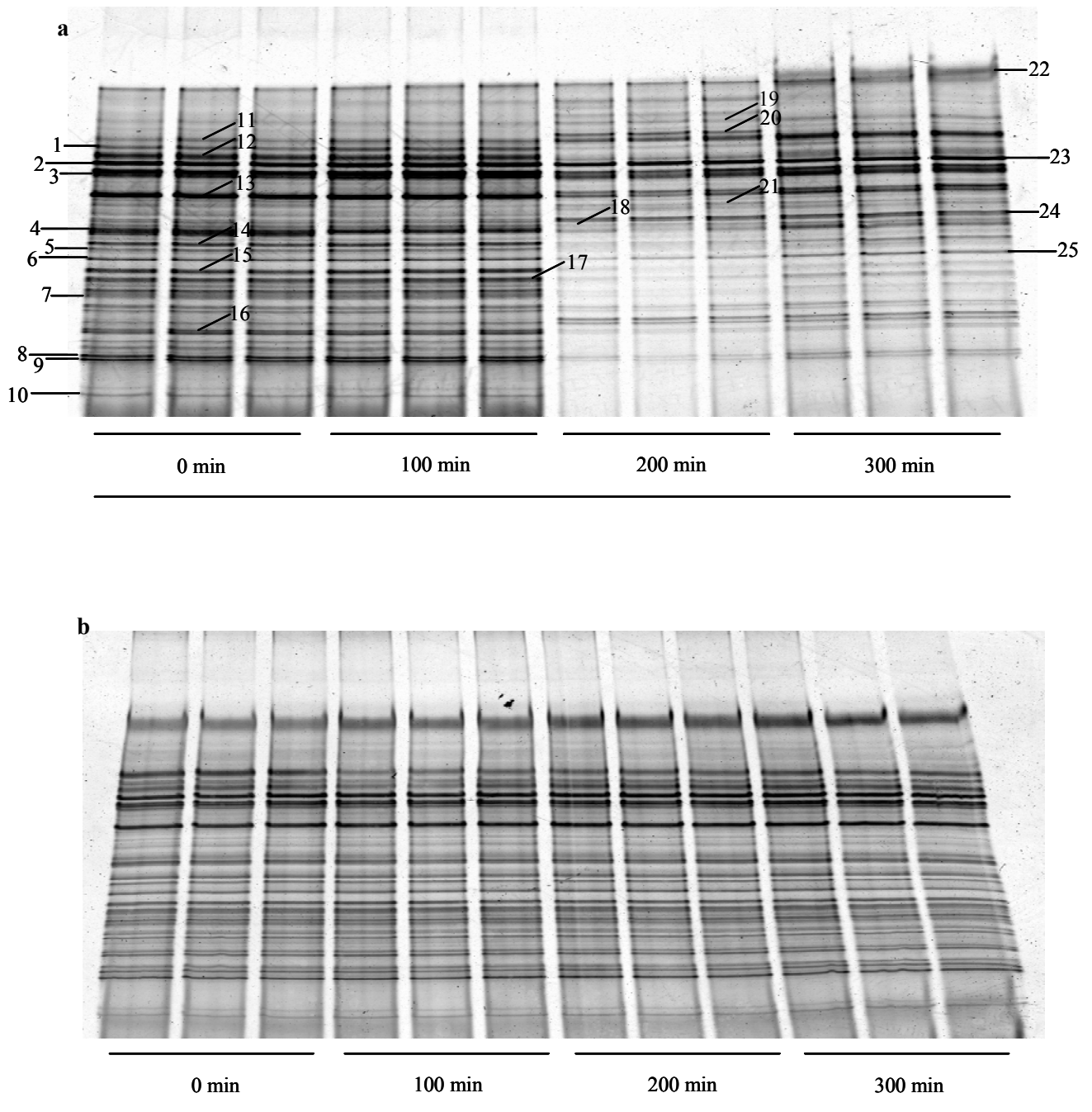
#### 4.4.2 Phylogenetische Veränderung von Symbiontenkonsortien

Das Symbiontenkonsortium wurde von *A. aerophoba* mit sehr stark verminderter Effizienz aufgenommen (Kap. 4.2). Durch eine DGGE-Analyse ( $n = 2$ ) wurden phylogenetische Veränderungen des Konsortiums während eines Filtrationsexperiments untersucht. Parallel dazu wurden die Zellzahlen (Diagramme nicht dargestellt) bestimmt und die Filtrationsraten errechnet. Über das gesamte 300 min Zeitintervall wurde eine durchschnittliche Filtrationsrate von  $r_n = 1,42 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  ermittelt. Die Daten zu den einzelnen Versuchen sind in Anhang A6 aufgelistet. Von den Wasserproben der 4 Zeitpunkte wurde die Gesamt-DNA isoliert. Bei den anschließenden molekularbiologischen Arbeitsschritten wurde eine Inhibition der Enzymreaktionen bei Bearbeitung der 200 und 300 min Proben beobachtet. Dieser Effekt trat nicht bei Proben des Kontrollansatzes (ohne Schwamm) auf. Als wahrscheinliche Ursache wurde die Freisetzung von Sekundärstoffen des Schwamms angesehen. Diese könnten bei der wiederholten Passage der Symbionten durch das Schwammgewebe freigesetzt worden sein. Die qualitativ beste Aufreinigung der DNA wurde durch Extraktion mit CTAB erhalten. Die Amplifikation der 16S rDNA erfolgte mit dem Primerpaar 341f GC / 534r, die Produkte wurden durch Agarosegel-Elektrophorese auf Spezifität der Amplifikation überprüft (Gele nicht dargestellt). Für die Zeitpunkte 200 und 300 min wurde eine verminderte DNA-Konzentration erhalten. Dies entsprach der gemessenen Reduktion der Zellzahl, ferner konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass noch eine geringe Sekundärstoffinhibition der DNA vorlag.

Für die DGGE-Gele wurde ein denaturierender Gradient von 0 - 90 % verwendet, die Elektrophorese erfolgte unter Standardbedingungen. Das Gel für Schwammindividuum 1 ist in Abbildung 4.4.2a dargestellt. Analog zu den Agarose-Gelen wurde ein verminderter DNA-Gehalt für die Zeitpunkte 200 und 300 min beobachtet. Die drei Replika-PCR-Reaktionen jedes Zeitpunkts zeigten jeweils dasselbe Bandenmuster. Die Auswertung des Gels ergab für den 0 min-Zeitpunkt 65 Banden, für den 300 min Zeitpunkt konnten noch 49 Banden detektiert werden. Bei der Klassifizierung wurden 16 Banden als verschwindende Banden beurteilt. Von diesen wurden 4 sequenziert. Die OTUs zeigten nächste Verwandtschaft zu den *Chloroflexi* (Bande 5, 7, 12) und zu den *Actinobacteria* (Bande 10). In die Gruppe der reduzierten Banden fielen 19, von diesen wurden 10 sequenziert. Die Sequenzen konnten den *Chloroflexi* (Bande 1, 9, 14, 15), den *Actinobacteria* (Bande 8, 16, 17), den *Gammaproteobacteria* (Bande 18), den *Alphaproteobacteria* (Bande 4) und den *Cyanobacteria* (Bande 13) zugeordnet werden. Als konstant wurden 30 Banden klassifiziert,

von diesen wurden 11 sequenziert. Nächste Verwandtschaft wurde zu den *Chloroflexi* (Bande 2 / 23, 3, 11, 22), den *Bacteroidetes* (Bande 6 / 25, 19), den *Gammaproteobacteria* (Bande 20, 24) und den *Cyanobacteria* (Bande 21) bestimmt. Die Daten der Sequenzierungen sind in Tabelle 4.4.2 zusammengefasst.

Für Schwamm 2 wurde ein Gel mit identischem Bandenmuster erhalten (nicht dargestellt). Bei dem DGGE-Gel der Kontrolle (Abb. 4.4.2b) konnten 66 Banden gezählt werden. Das Bandenmuster ist für die jeweils 3 unabhängigen PCR-Reaktionen jedes Zeitpunkts identisch und die Bandenstärke über die Zeit konstant.



**Abb. 4.4.2:** DGGE-Analyse der phylogenetischen Veränderungen des bakteriellen Symbiontenkonsortiums durch Filtration von *A. aerophoba*. **a:** DGGE-Gel von Schwammindividuum 1 mit jeweils 3 Replikaproben je Zeitpunkt. Sequenzierte Banden sind gekennzeichnet. **b:** DGGE-Gel der Kontrolle.

**Tab. 4.4.2:** Sequenzierung der Banden des DGGE-Gels des bakteriellen Schwammsymbionten-Konsortiums.

DGGE-Muster	DGGE-Bande	Methode	Homologie (%)	Länge (bp)	Nächster Verwandter mit GenBank-Nummer	Phylum
Verschwindend	5	kloniert	98	168 / 170	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK79 (AJ347081.1) u. TK16 (AJ347035.1)	<i>Chloroflexi</i>
Verschwindend	7	kloniert	98	167 / 169	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK79 (AJ347081.1) u. TK16 (AJ347035.1)	<i>Chloroflexi</i>
Verschwindend	10	kloniert	95	164 / 171	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK99 (AJ347072.1)	<i>Actinobacteria</i>
Verschwindend	12	kloniert	97	164 / 169	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK32 (AJ347042.1)	<i>Chloroflexi</i>
Reduziert	1	direkt	96	132 / 137	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK32 (AJ347042.1)	<i>Chloroflexi</i>
Reduziert	4	kloniert	97	164 / 169	Unkult. Korallen-assoz. Bak., Klon BM89MF1BA4 (AF365442.1)	<i>Alphaproteobacteria</i>
Reduziert	8	direkt	94	65 / 69	Unkult. <i>Theonella swinhoei</i> Klon RSWS12 (AF434941.1)	<i>Actinobacteria</i>
Reduziert	9	direkt	90	117 / 129	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK79 (AJ347081.1) u. TK16 (AJ347035.1)	<i>Chloroflexi</i>
Reduziert	13	direkt	97	146 / 150	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK09 (AJ347056.1)	<i>Cyanobacteria</i>
Reduziert	14	direkt	89	101 / 113	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK79 (AJ347081.1) u. TK16 (AJ347035.1)	<i>Chloroflexi</i>
Reduziert	15	direkt	91	125 / 137	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK74 (AJ347079.1) u. TK18 (AJ347037.1)	<i>Chloroflexi</i>
Reduziert	16	kloniert	97	109 / 112	Unkult. <i>Theonella swinhoei</i> Klon JAWS11 (AF434969.1)	<i>Actinobacteria</i>
Reduziert	17	direkt	98	121 / 123	Unkult. Schwamm-assoz. <i>Actinobacterium</i> sp., Klon XA2C06 (AY954059.1)	<i>Actinobacteria</i>
Reduziert	18	kloniert	96	184 / 191	Unkult. $\gamma$ - <i>Proteobak.</i> aus mar. Sediment, Klon BS1-0-40 (AY254915.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Konstant	2 / 23	direkt	97	134 / 137	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK32 (AJ347042.1)	<i>Chloroflexi</i>
Konstant	3	direkt	98	136 / 138	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK79 (AJ347081.1)	<i>Chloroflexi</i>
Konstant	6 / 25	kloniert	>90	>140 / 154	Unkult. <i>Theonella swinhoei</i> Klon RSWS18 (AF434946.1)	<i>Bacteroidetes</i>
Konstant	11	direkt	99	169 / 170	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK106 (AJ347074.1)	<i>Chloroflexi</i>
Konstant	19	direkt	91	133 / 145	<i>Psychroserpens burtonensis</i> (AY771714.1)	<i>Bacteroidetes</i>
Konstant	20	direkt	99	171 / 172	Isolat v. Weichkoralle UST991139-039 (AF465357.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>
Konstant	21	direkt	98	128 / 130	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK09 (AJ347056.1)	<i>Cyanobacteria</i>
Konstant	22	kloniert	100	169 / 169	Unkult. <i>A. aerophoba</i> Klon TK79 (AJ347081.1) u. TK16 (AJ347035.1)	<i>Chloroflexi</i>
Konstant	24	kloniert	91	173 / 190	Unkult. <i>Pseudoalteromonas</i> sp. Klon SIMO-836 (AY712373.1)	<i>Gammaproteobacteria</i>

#### 4.4.3 Veränderungen von Konsortienzusammensetzungen durch bakterienarme Schwämme

Die Veränderungen der phylogenetischen Zusammensetzung des bakteriellen Seewasserkonsortiums wurden an zwei Individuen des bakterienarmen Schwamms *T. aurantium* untersucht. Nach 300 min war die Bakterienzahl, verglichen mit der Kontrolle, um durchschnittlich 0,77 log-Stufen reduziert worden (Diagramme nicht dargestellt). Die über das 300 min Intervall bestimmte Filtrationsrate lag bei durchschnittlich  $r = 9,33 \times 10^5$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm (Nassmasse)  $h^{-1}$  (Anhang A6). In den Agarose- und DGGE-Gelen (Gradient von 0 - 80 %) wurde für alle Zeitpunkte ein, nach visueller Beurteilung, gleicher DNA-Gehalt erhalten. Die im Experiment gemessene Verminderung der Zellzahl fand, trotz sensibel ausgewählter PCR-Bedingungen, keine proportionale Entsprechung in der erhaltenen PCR-Produktmenge. In den DGGE-Gelen beider untersuchter Schwammindividuen wurde ein für alle Replikaproben und für alle Zeitpunkte konstantes Bandenmuster mit 30 nachweisbaren Banden gefunden (Gele nicht dargestellt). Die Gleichförmigkeit des Bandenmusters deutete darauf hin, dass keine deutliche Selektivität bei der bakteriellen Filtration stattgefunden hatte. Die Gele der Filtrationsexperimente entsprachen mit ihrem konstanten Bandenmuster dem Gel der Kontrolle (nicht dargestellt).

Die Veränderung der phylogenetischen Zusammensetzung des Symbiontenkonsortiums (aus *A. aerophoba* präpariert) wurde an zwei Individuen von *T. aurantium* untersucht. Nach 300 min wurde eine Verminderung der Symbiontenkonzentration um 1,50 log-Stufen, verglichen mit der Kontrolle, gemessen (Diagramme nicht dargestellt). Die Filtrationsraten für das 300 min Intervall lagen bei durchschnittlich  $r = 1,31 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$ , die einzelnen Daten sind in Anhang A6 zusammengefasst. Bei der Kontrolle der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese wurde für die 0 min-Probe, nach visueller Beurteilung, der höchste DNA-Gehalte beobachtet, spätere Probenzeitpunkte enthielten eine leicht reduzierte DNA-Konzentration. Auf den DGGE-Gelen (denaturierender Gradient 5 - 90 %, Gele nicht dargestellt) wurden identische Bandenmuster für die jeweils drei Replikaproben erhalten. Für die 0 min-Proben mit dem höchsten DNA-Gehalt, wurden für beide Schwammindividuen 59 Banden gezählt. Für den 300 min Zeitpunkt wurden 52, bzw. 51, Banden für das jeweilige Individuum ausgezählt. Sieben, bzw. acht Banden wurden der Gruppe der verschwindenden Banden zugerechnet, 51, bzw. 50, Banden wurden als reduzierte Banden beurteilt und eine Bande wurde als konstant klassifiziert. Sämtliche, als verschwindend klassifizierte Banden, zeigten schon beim 0 min-Wert eine sehr geringe Bandenstärke, sodass eine leichte

Reduktion des DNA-Gehaltes ausreichte, um diese nicht mehr detektieren zu können. Das über den zeitlichen Verlauf fast gleichförmige Bandenmuster, mit überwiegend leichter Reduktion der Bandenstärke, deutete auf keine deutliche Selektivität gegenüber bestimmten Phylotypen hin.

## 4.5 Interne Prozessierung aufgenommenener Partikel und Bakterien

Zur mikroskopischen Untersuchung der Aufnahme- und Prozessierungsmechanismen im Schwammgewebe wurden fluoreszierende Latex Beads und fluoreszenzmarkierte Bakterien verwendet. Die Untersuchungen erfolgten an *A. aerophoba*, als Modellorganismus für bakterienhaltige Schwämme, und an *D. avara*, als Modell für bakterienarme Schwämme.

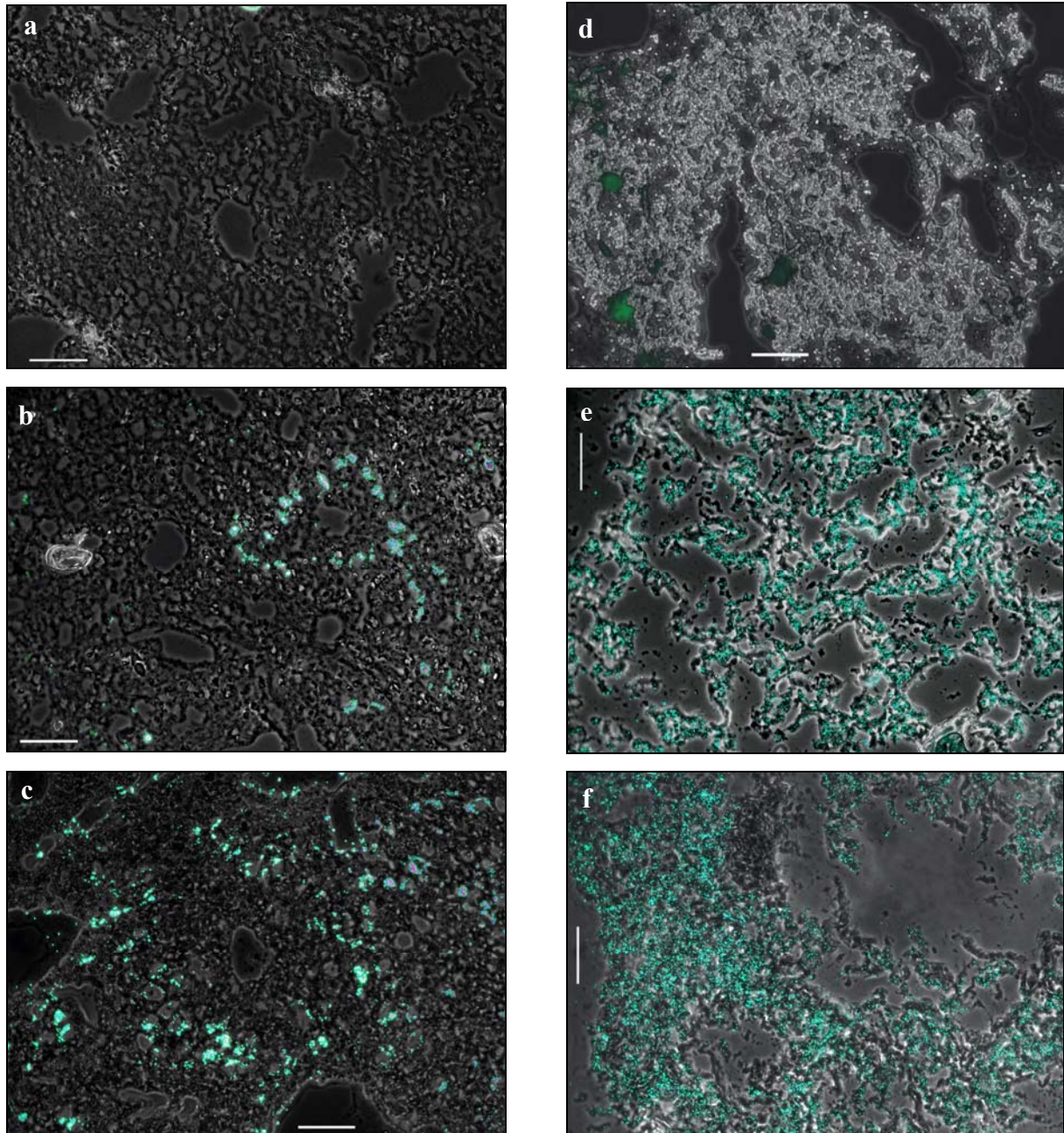
### 4.5.1 Aufnahme von Latex Beads

Die Verwendung von Latex Beads bei Aufnahmeprozessen bietet den Vorteil normierter Partikelparameter (Durchmesser, Oberfläche und Form). Die Beschichtung mit Fluoreszenzfarbstoffen macht sie geeignet für mikroskopische Studien. Ein weiterer Vorteil ist die Unverdaulichkeit, einhergehend mit einer Anhäufung im Schwammgewebe (Turon et al., 1997). Die verwendeten Latex Beads hatten eine mit Bakterienzellen vergleichbare Größe von 1,0  $\mu\text{m}$ . Für die Studie wurden Filtrationsexperimente durchgeführt, dabei wurden unmittelbar vor Zugabe der Beads die Gewebeprobe des 0 min-Zeitpunkts entnommen. Die Konzentration der Beads betrug  $\sim 7 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Die weiteren Probennahmen erfolgten nach 30, 120, 180, 240 und 300 min Inkubationszeit. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an Kryoschnitten mit einer Dicke von  $\sim 5 \mu\text{m}$ .

#### 4.5.1.1 Verteilung in der Mesohylmatrix

Bei *A. aerophoba* (Abb. 4.5.1a - c) wurden in der 30 min-Probe (Abb. 4.5.1b) bereits zahlreiche Latex Beads im Gewebe gefunden. Sie lagen in der Nähe der wasserführenden Kanäle oder der Choanocytenkammern in beinahe konzentrisch-ringförmigen Mustern vor. Die Beads waren fast ausschließlich in Form von Aggregaten mit einem Durchmesser von 5 - 20  $\mu\text{m}$  angeordnet. Bei der 300 min-Probe (Abb. 4.5.1c) lagen die Aggregate tiefer im Mesohyl vor. Ihre Anzahl erschien hier, verglichen mit der 30 min-Probe, erhöht. Es konnten teilweise auch mehrfache konzentrische Anordnungen der Aggregate beobachtet werden, die auf eine fortlaufende, phasische Aufnahme der Beads hindeuteten. Weitere Probenzeitpunkte (nicht dargestellt) zeigten kontinuierliche Zwischenstufen der dargestellten Zeitpunkte.

Bei *D. avara* (Abb. 4.5.1d - f) lagen in der 30 min-Probe (Abb. 4.5.1e) hohe Konzentrationen von Beads im Gewebe vor. Dabei waren die Beads gleichförmig in dem lockeren Gewebe verteilt. Es konnten keine Anhäufungen und Aggregationen beobachtet werden. Für die 300 min-Probe (Abb. 4.5.1f) wurde, nach visueller Beurteilung, keine deutliche weitere Erhöhung der Beads-Konzentration festgestellt. Die bereits nach 30 min beobachtete hohe Anzahl von Beads, mit der weitläufigen Verteilung im Gewebe, legte eine schnelle Aufnahme und Verteilung von Nahrungspartikeln nahe.

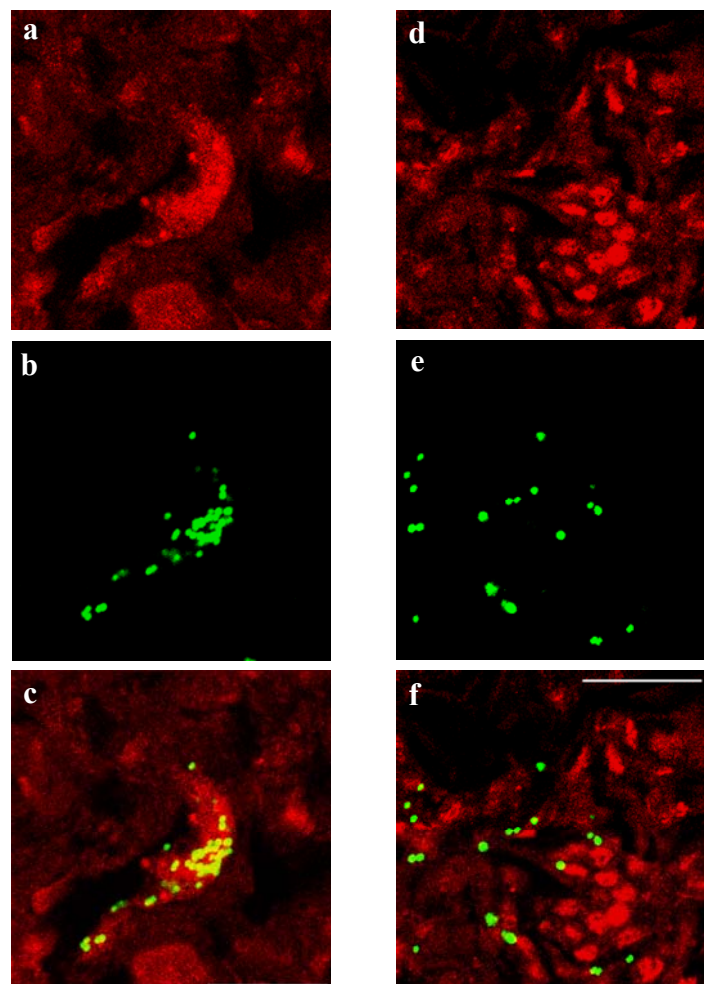


**Abb. 4.5.1a - f:** Aufnahme von Latex Beads in das Schwammgewebe. Phasenkontrast überlagert mit Epifluoreszenz, Weiß-, Blau- und Violettöne im Bereich der Beads stellen sehr hohe Fluoreszenzintensitäten dar. **a - c:** *A. aerophoba*; **d - f:** *D. avara*. **a, d:** 0 min; **b, e:** 30 min; **c, f:** 300 min. Maßstab: 50  $\mu$ m.



### 4.5.1.2 Feinlokalisierung in der Mesohylmatrix

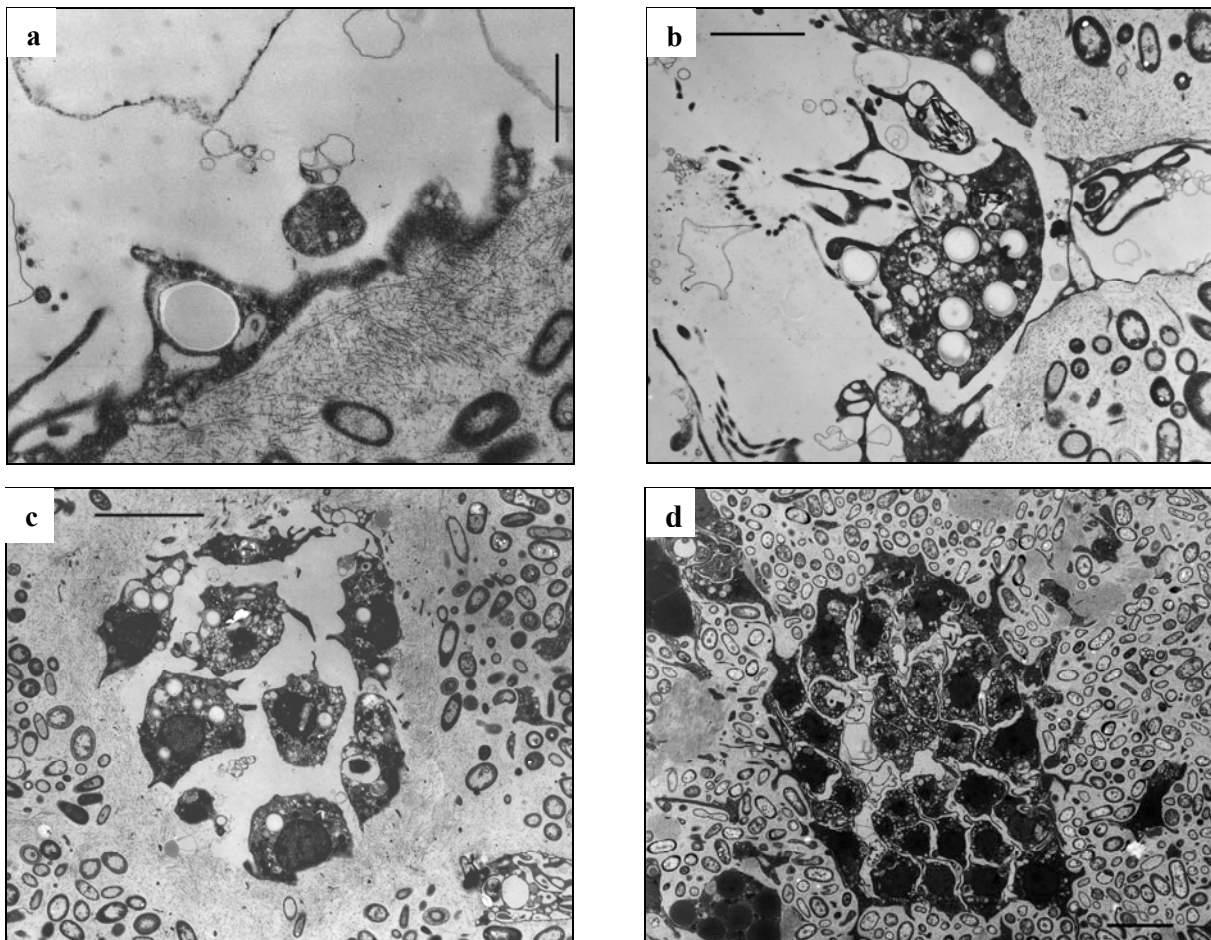
Um zu untersuchen, ob die Latex Beads im Schwammgewebe intrazellulär vorlagen, wurde Confokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) angewandt. Es wurden Kryoschnitte des Gewebes von *A. aerophoba* und *D. avara* nach 300 min Inkubation mit Latex Beads untersucht. Die Schwammzellen waren mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin spezifisch gefärbt worden. Abbildung 4.5.2a - c zeigt die Verteilung der Beads im Gewebe von *A. aerophoba*. Wie im Überlagerungsbild (Abb. 4.5.2c) der beiden chromatischen Kanäle erkennbar ist, kolokalisierten die als Aggregate vorliegenden Beads mit den Schwammzellen. Auffallend ist der angefärbte, über 20  $\mu\text{m}$  große Schwammzellbereich. Die gewöhnlich vereinzelt im Mesohyl von *A. aerophoba* vorliegenden Schwammzellen haben nach



**Abb. 4.5.2a - f:** Lokalisation von Latex Beads im Schwammgewebe nach 300 min Inkubation. **a - c:** *A. aerophoba*; **d - f:** *D. avara*. **a, d:** Emissionskanal für TRITC-gekoppeltes Phalloidin; **b, e:** Emissionskanal für Fluorescein-markierte Latex Beads; **c, f:** Bildüberlagerung. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ . Optische Schichtdicke < 600 nm.

elektronenmikroskopischem Befund meist eine Größe von  $<10\ \mu\text{m}$ . Die CLSM-Aufnahmen für *D. avara* sind in Abbildung 4.5.2d - f dargestellt. In der Kanalüberlagerung (Abb. 4.5.2f) liegen die Beads zwar in unmittelbarer Nähe zu den Schwammzellen vor, jedoch wurde keine Kollokalisierung erkannt.

Das intrazelluläre Vorliegen der Latex Beads-Aggregate in den Schwammzellen von *A. aerophoba* wurde durch Elektronenmikroskopie bestätigt. Die Latex Beads wurden in Endopinacozyten und Choanozyten (Abb. 4.5.3a, b) nachgewiesen. Abbildung 4.5.3c zeigt eine Beads-gefüllte Gruppe von Amöbozyten im Mesohyl, die der im CLSM gefundenen großen Schwammzellstruktur (Abb. 4.5.2c) entsprechen dürfte. Die Schwammzellen waren hier durch Schrumpfungsartefakte auseinander gerissen worden und dürften *in vivo* als eng beieinander liegende Zellgruppe, ähnlich wie in Abb. 4.5.3d, vorgelegen haben.



**Abb. 4.5.3a - d:** Phagozytose und Transport von Latex Beads in *A. aerophoba*. **a:** Endopinacozyt mit Latex Bead,  $1\ \mu\text{m}$ ; **b:** Choanozyt gefüllt mit Latex Beads,  $3\ \mu\text{m}$ ; **c:** Aggregat von Beads-gefüllten Amöbozyten im Mesohyl,  $5\ \mu\text{m}$ ; **d:** Aggregat von Schwammzellen im Mesohyl,  $5\ \mu\text{m}$ .

### 4.5.2 Aufnahme von *Vibrio* sp. MMW1

Um die Aufnahme und Prozessierung lebender Bakterienzellen mikroskopisch untersuchen zu können, wurde der GFP-exprimierende *Vibrio* sp. MMW1 verwendet. In Filtrationsexperimenten wurde *Vibrio* sp. MMW1 ebenso wie das ursprüngliche wildtypische Isolat *Vibrio* sp. SB177 sehr effizient von *A. aerophoba* aufgenommen (Abb. 4.5.4). Die durchschnittliche normalisierte Filtrationsrate lag bei  $r_n = 2,85 \times 10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm  $h^{-1}$  und damit leicht über dem durchschnittlichen  $r_n$ -Wert von  $2,76 \pm 0,21 \times 10^6$  für *Vibrio* sp. SB177 (Kap. 4.2.).

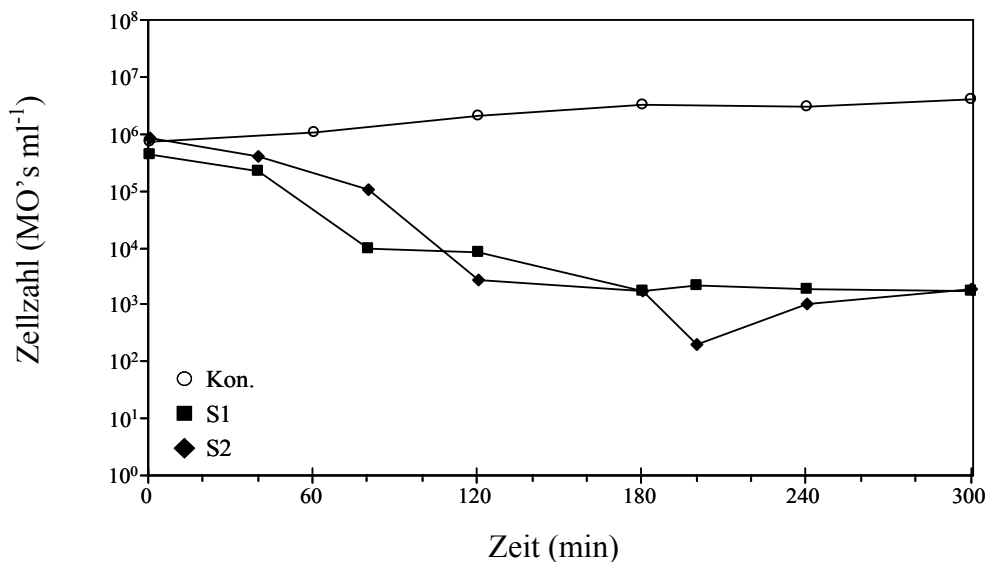
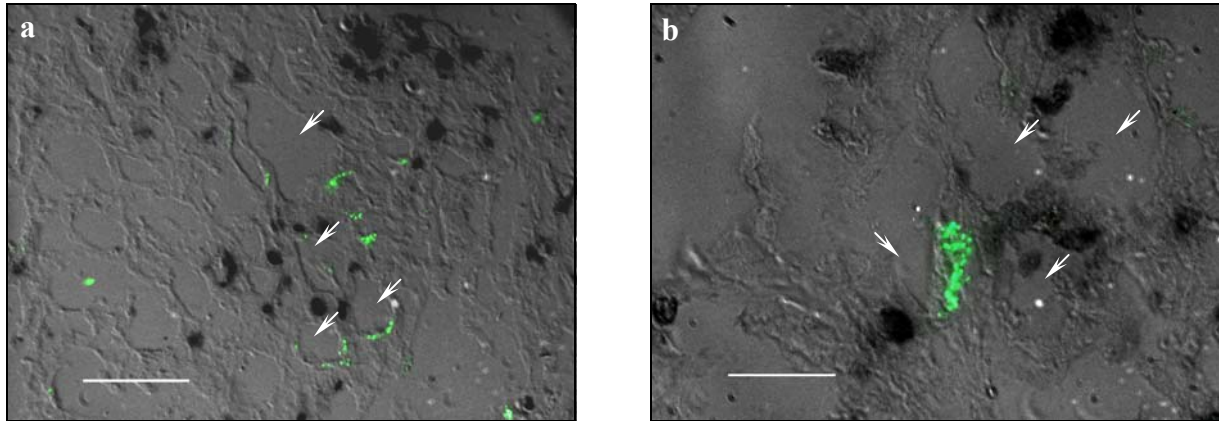


Abb. 4.5.4: Filtration von *Vibrio* sp. MMW1 durch *A. aerophoba*.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden Gewebeproben nach 30, 120, 180, 240 und 300 Minuten Inkubationszeit mit *Vibrio* sp. MMW1 entnommen. Die Kryoschnitte der diversen Zeitpunkte zeigten bei mikroskopischer Inspektion keine Unterschiede. In allen Gewebeproben wurden die Bakterienzellen in der Nähe des wasserführenden Systems (Wasserkanäle / Choanozytenkammer) beobachtet (Abb. 4.5.5a, b). Dabei waren die aufgenommenen Bakterienzellen, ähnlich wie Latex Beads, häufig in Gruppen angeordnet. Im tieferen Mesohyl wurden keine fluoreszierenden Zellen gefunden. Dies deutete auf eine effiziente und schnelle Lyse der Bakterienzellen, mit einhergehender Fluoreszenzlöschung des GFP's, hin.

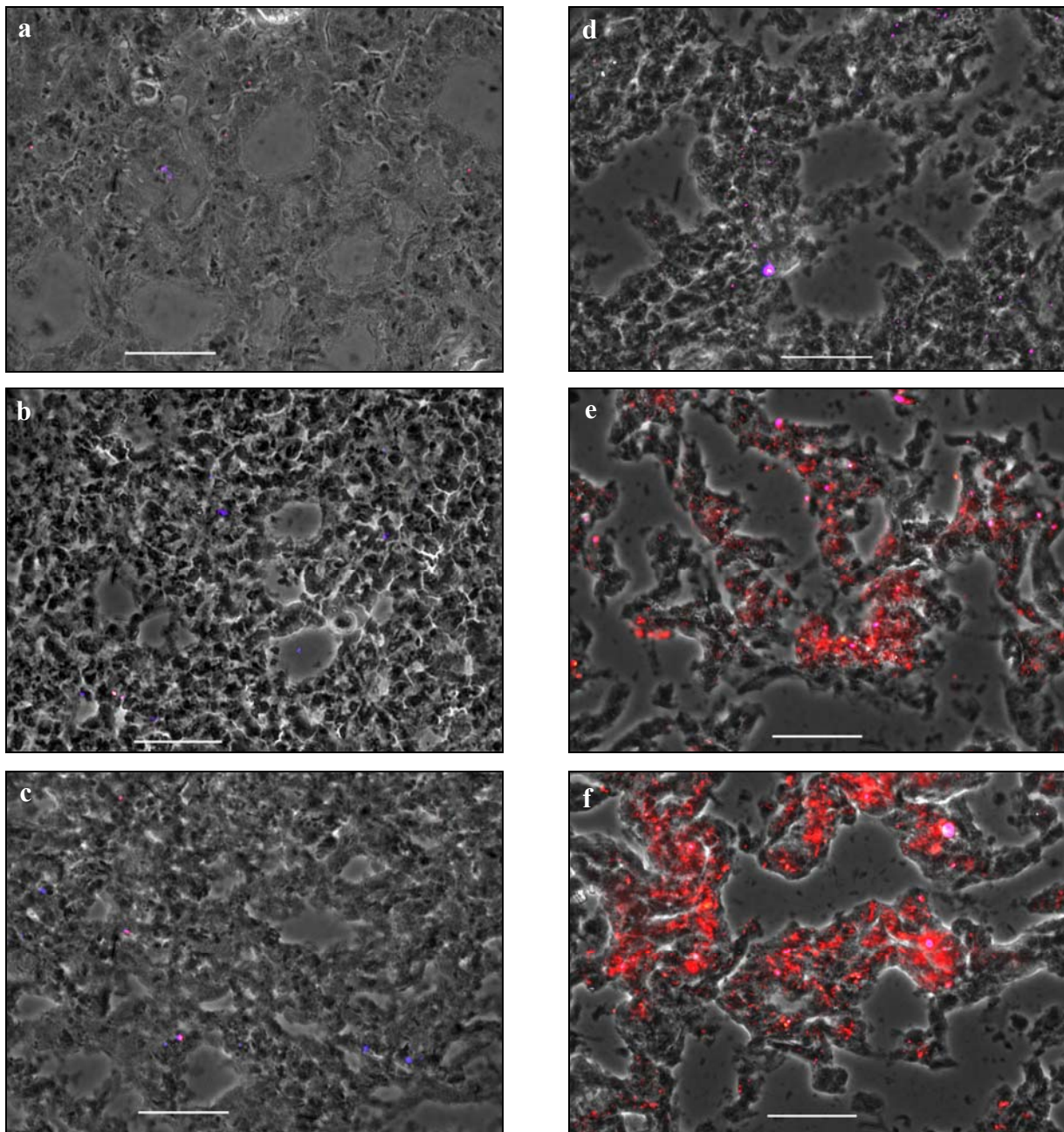


**Abb. 4.5.5a, b:** Aufnahme von *Vibrio* sp. MMW1 durch *A. aerophoba* nach 240 min Inkubation. Phasenkontrast überlagert mit Epifluoreszenz. Wassersystem des Schwamms mit Pfeilsymbolen gekennzeichnet. Maßstab in **a:** 40  $\mu\text{m}$ , **b:** 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.5.3 Aufnahme von Rhodamin-markierten Schwammsymbionten

Schwammsymbionten wurden aus *A. aerophoba* präpariert und mit 5,6-TAMRA angefärbt. Zur Visualisierung der Aufnahme wurden Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* und dem bakterienarmen Schwamm *D. avara* durchgeführt. Bei *A. aerophoba* (Abb. 4.5.6a - c) konnten in den untersuchten Gewebeproben nach 30 und 300 Minuten keine angefärbten Symbionten entdeckt werden. Lediglich vereinzelt wurden Cyanobakterien gefunden, die vermutlich beim Anfertigen der Kryoschnitte als Kontamination ins Mesohyl gelangt waren.

Bei *D. avara* (Abb. 4.5.6d - f) wurden ebenfalls vereinzelt Cyanobakterien im Mesohyl vorgefunden. Nach 30 und 300 Minuten Inkubationszeit lag eine hohe Anzahl von Symbionten in Mesohyl vor. Die Verteilung der aufgenommenen Bakterien war relativ gleichmäßig und erstreckte sich auch auf die tieferen Mesohylbereiche. Bei der Untersuchung zahlreicher Präparate wurde zwischen 30 und 300 Minuten Inkubationszeit keine offensichtliche Zunahme der Symbiontenzahl im Gewebe beobachtet.



**Abb. 4.5.6a - f:** Aufnahme von Rhodamin-markierten Schwammsymbionten in das Schwammgewebe. Phasenkontrast überlagert mit Epifluoreszenz. Intrinsic Cyano-bakterien: blau oder pink, markierte Schwammsymbionten: rot. **a - c:** *A. aerophoba*; **d - f:** *D. avara*; **a, d:** 0 min; **b, e:** 30 min; **c, f:** 300 min. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .



## 5 Diskussion

### 5.1 Die mikrobielle Assoziation mariner *Demospongiae*

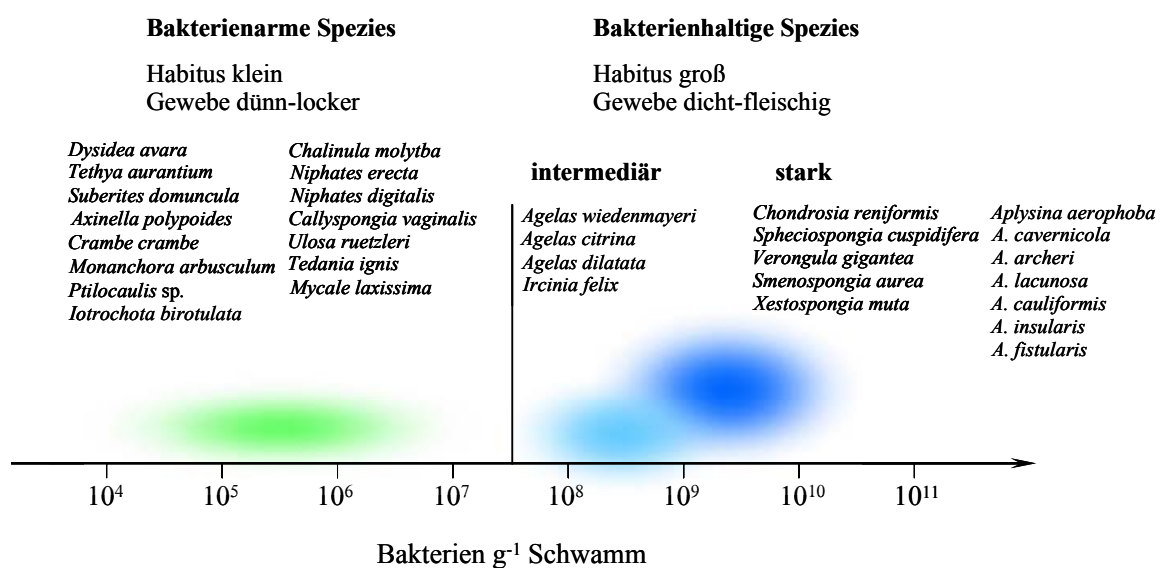
Interspezifische Interaktionen spielen in der belebten Umwelt eine große Rolle und die Bedeutung für Physiologie, Ökologie und Artendiversität werden immer mehr erkannt. Für das Phylum *Porifera* wurden in den 70er Jahren erste detaillierte mikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass ausgewählte Schwämme eine hohe Anzahl von Mikroorganismen in ihrem Gewebe tragen, während andere eine nur sehr geringe Anzahl beherbergen (Vacelet 1971, Vacelet & Donadey 1977). Bei den enthaltenen Bakterien kann zwischen phototrophen Cyanobakterien und als heterotroph bezeichneten, nicht phototrophen Bakterien differenziert werden. Dabei ist die Assoziation von Cyanobakterien nicht mit dem Vorliegen von heterotrophen Symbionten gekoppelt. Während einige Schwammspezies, wie z. B. *Pericharax heteroraphis*, Cyanobakterien im Cortex tragen, ist das Mesohyl praktisch frei von heterotrophen Symbionten (Wilkinson 1978 I). Andererseits ist das Mesohyl des mediterranen *Chondrosia reniformis* dicht mit heterotrophen Bakterien gefüllt und im Cortex liegen keine Cyanobakterien vor (Wilkinson & Vacelet 1979). Im Mittelpunkt der Untersuchung dieser Arbeit standen die im Mesohyl vorliegenden nicht-phototrophen Mikroorganismen, die bis zu 40 %, in Einzelfällen bis zu 60 % (Magnino et al. 1999), der Gesamtbiomasse ausmachen. Obgleich bislang eindeutige Funktionsnachweise für eine Symbiose fehlen, deuten doch zahlreiche Merkmale, wie die permanente, stabile Assoziation der mikrobiellen Konsortien mit zahlreichen Schwammspezies darauf hin. Diese Assoziation ist für die entsprechenden Schwämme von so großer Bedeutung, dass eine vertikale Weitergabe der Prokaryoten über die Reproduktionsstadien erfolgt (Gallissian & Vacelet 1976, Kaye 1991, Usher et al. 2001, Usher et al. 2005). Dabei sind die Bakterien in der Oozyte und den frühen Zygotenstadien zunächst intrazellulär lokalisiert. In späteren Larvalstadien erfolgt die Umorganisation und die Bakterien nehmen ihre extrazelluläre Lokalisation wie im Adulttier ein (Usher et al. 2001, Wehrl in Vorbereitung).

#### 5.1.1 Elektronenmikroskopische Beurteilung der Bakterienhaltigkeit

Trotz zahlreicher Studien zur Schwamm-Mikroorganismen-Assoziation beschränkt sich das aktuelle Wissen über die Bakterienhaltigkeit auf kaum mehr als zwei Dutzend

Schwammspezies (zusammengefasst in Hentschel et al. 2003). Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden 31 Spezies untersucht (Abb. 5.1.1). Die systematische Untersuchung der Bakterienhaltigkeit erfolgte durch Transmissionselektronenmikroskopie, da insbesondere durch diese Methode die Identität von Bakterien durch die Visualisierung zellulärer Charakteristika geprüft werden konnte. Die mikroskopischen Befunde erlauben die Einordnung der *Porifera* in mindestens zwei Gruppen.

Die Gruppe der bakterienhaltigen Schwämme trägt in allen Bereichen des Körpers eine hohe Anzahl von Symbionten, die überwiegend extrazellulär zwischen den Schwammzellen vorliegen. Die Quantifizierung des Bakteriengehalts ergab hier Werte im Bereich von  $10^8$  -  $10^{10}$  Mikroben  $g^{-1}$  Schwamm. Aufgrund des beobachteten Verteilungsmusters der Bakterien im Mesohyl wurde in dieser Arbeit eine Unterscheidung in stark und in intermediär bakterienhaltige Schwämme vorgenommen. Während die stark bakterienhaltigen Vertreter eine nahezu homogene Verteilung der Bakterien aufwiesen, zeigten die intermediär bakterienhaltigen Spezies starke lokale Unterschiede. Die Prokaryotenzellen lagen hier in 20 - >100  $\mu m$  großen Anhäufungen (Clustern) dicht nebeneinander und wurden von großen, zellfreien ECM-Bereichen umgeben. Diese bakteriellen Cluster wurden in allen untersuchten Körperstellen der Tiere gefunden. Die mikrobiellen Zellkonzentrationen der intermediär bakterienhaltigen Spezies lag im unteren Bereich der bakterienhaltigen Schwämme ( $10^8$  -  $10^9$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm). Eine graphische Zusammenfassung der unterschiedlichen Gruppen der Bakterienhaltigkeit zeigt Abb. 5.1.1.



**Abb. 5.1.1:** Die in dieser Arbeit zu Grunde gelegte Gruppierung mariner *Porifera* bezüglich ihrer Bakterienhaltigkeit mit Angabe der bakteriellen Zellzahlen.



Morphologisch haben die bakterienhaltigen Spezies oftmals einen größeren Habitus als die bakterienarmen Schwämme, so auch z. B. *Xestospongia muta* (engl.: „great barrel sponge“), der oftmals Größen von über 1 m erreicht. Einhergehend mit einem schwach ausgebildeten Wasserkanalsystem ist das Mesohyl sehr massiv ausgebildet. Choanozytenkammern nehmen in dem dicht mit Bakterien gefüllten Mesohyl nur ein kleines Volumen ein, wobei ihre Durchmesser für ausgewählte Vertreter mit 18 - 26 µm als relativ klein beschrieben wird (Wilkinson 1978 I).

Sowohl für die stark als auch für die intermediär bakterienhaltigen Schwämme wurden im Gewebe verschiedene bakterielle Morphotypen gefunden. Vacelet (1975) unterscheidet zwischen fünf verschiedenen Morphotypen in *A. aerophoba*, weitere Arbeiten bestätigen die morphologische Vielfalt (Wilkinson 1978 III, Friedrich et al. 1999). Die Morphologie der bakteriellen Zellwände legt nahe, dass es sich überwiegend um Gram-negative Zellen handelt, die oftmals zusätzliche Membranen tragen (Typ C) oder von Schleimschichten umgeben sind (Typ D). Morphologisch außergewöhnliche Zellen werden durch den Typ E beschrieben. Diese Zellen weisen eine intrazelluläre Kompartimentierung auf. Das Nucleoid ist hier von einer Membran umhüllt (Fuerst et al. 1998). Eine funktionell ähnliche Anatomie ist für Planctomyceten beschrieben, die über das sogenannte Pirellosom verfügen (Fuerst 1995, Fuerst 2005). Bei Untersuchungen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an den schwammspezifischen *Poribacteria* wurden ringförmige Fluoreszenzsignale erhalten (Fieseler et al. 2004, Fieseler 2005), dies wird als Indiz für ein ringförmig ausgebildetes Zytoplasma dieser Zellen gedeutet. Eine solche Zonierung entspricht funktionell dem elektronenmikroskopisch beobachteten Zelltyp E. Sowohl für die intermediär, also auch für die stark bakterienhaltigen Schwämme wurden keine Anhäufungen von bakteriellen Morphotypen innerhalb bestimmter Gewebestellen beobachtet. Für die Symbionten wurden vereinzelt Teilungsereignisse, gleichzeitig aber auch Phagozytose durch Schwammzellen beobachtet. Beide gegenläufigen Prozesse scheinen im Gleichgewicht zu stehen, sodass das bakterielle Konsortium von dynamischer Stabilität zu sein scheint. Vermutlich ist die Phagozytoserate und die Vermehrungsrate der Symbionten so gering, dass eine lokale Anhäufung eines bestimmten Morphotyps ausbleibt.

Für die Gruppe der bakterienarmen Schwämme wurden keine heterotrophen Prokaryoten im meist massiv ausgebildeten Mesohyl gefunden. Diese Gruppe wird als bakterienarm bezeichnet, da einzelne Spezies Cyanobakterien im Cortex tragen können. Die Quantifizierung der bakteriellen Zellzahlen dieser Vertreter ergab Werte von typischerweise  $10^5$  -  $10^6$  Bakterien  $g^{-1}$  Schwamm. Damit sind die bakteriellen Zellkonzentrationen dieser

Schwämme ähnlich zu denen des natürlichen Seewassers. Der Habitus der bakterienarmen Schwämme ist zumeist klein, sie weisen oftmals eine nur geringe Gewebedicke auf und haben folglich ein relativ großes Oberflächen / Volumen-Verhältnis. Das Wasserkanalsystem kann sehr variabel ausgebildet sein, bei *Dysidea avara* ist das Mesohyl zugunsten des Kanalsystems mit großvolumig angelegtem Choanoderm reduziert. Bei zahlreichen anderen Schwämmen, wie z. B. *Suberites domuncula*, ist das Mesohyl sehr massiv ausgebildet. Aufgrund der geringen Dichte an Schwammzellen besteht es jedoch überwiegend aus ECM. Vergleichende anatomische Studien deuten darauf hin, dass bakterienarme Schwämme über besonders große Choanocytenkammern verfügen könnten (Wilkinson 1978 I).

### 5.1.2 Korrelation zwischen Bakterienhaltigkeit und mikrobieller Diversität

Die mikroskopische Klassifizierung der Bakterienhaltigkeit wird auch durch die Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen widergespiegelt. Bakterienhaltige Schwämme weisen eine hohe Diversität an nachweisbaren bakteriellen Phylotypen auf („high-microbial-abundance sponges“, Hentschel et al. 2003). Die überwiegende Mehrzahl der Sequenzen fällt in Phyla, die in natürlichen Seewasserkonsortien (Venter et al. 2004) meist nur zu einem geringen Anteil vertreten sind, so z. B. *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* (Hentschel et al. 2003, 2006, Hill et al. 2006). Darüber hinaus konnten Vertreter des Phylums *Poribacteria* bislang nur in bakterienhaltigen Schwämmen nachgewiesen werden (Fieseler et al. 2004, Fieseler 2005). Für unterschiedliche Schwammspezies aus verschiedenen Habitaten werden sehr ähnliche bakterielle Sequenzen nachgewiesen. Diese Sequenzen bilden innerhalb der jeweiligen bakteriellen Phyla schwammspezifische Cluster (Hentschel et al. 2002). Verschiedene Schwammspezies beherbergen ein jeweils artkonstantes Set dieser bakteriellen Cluster. Beim Vergleich der Spezies *A. aerophoba*, *T. swinhoei* und *R. odorabile* besteht die gemeinsame mikrobielle Signatur aus fünf schwammspezifischen Cluster (Abb. 5.1.2), (Hentschel et al. 2002, 2003, 2006). Die vergleichende Charakterisierung mikrobieller Konsortien weiterer Schwammspezies könnte zukünftig die Benennung eines oder mehrerer „Konsensus“-Cluster erlauben, die essentiell in solchen Schwämme gefunden werden, die mikroskopisch als bakterienhaltig klassifiziert werden.

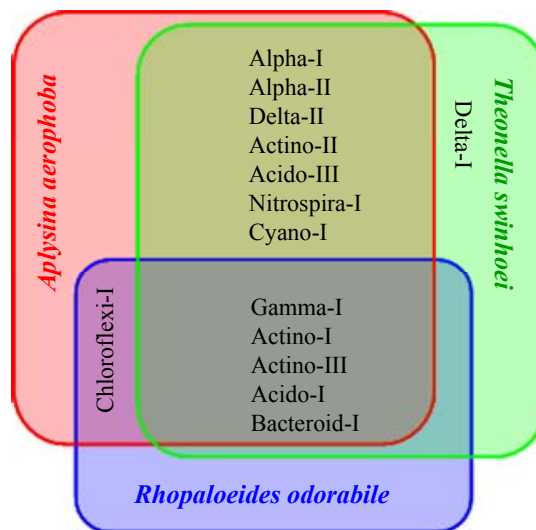


Abb. 5.1.2: Verteilung von schwammspezifischen bakteriellen Cluster in drei marinen bakterienhaltigen Schwämmen. Aus: Hentschel et al. 2003.

Im Vergleich zu den bakterienhaltigen Schwämmen weisen bakterienarme Spezies eine relativ geringe Diversität an nachweisbaren bakteriellen Phylotypen auf („low-microbial-abundance sponges“, Hentschel et al. 2003). Die 16S rDNA-Signaturen dieser Bakterien zeigen häufig nahe Verwandtschaft zu bakteriellen Seewasservertretern (Taylor et al. 2004, Webster et al. 2004, Gernert et al. 2005, Taylor et al. 2005, Li et al. 2006, Wichels et al. 2006). Für diese Phylotypen bleibt zu prüfen, ob es sich um Seewasserbakterien, auf der Oberfläche des Tieres assoziierte Bakterien oder wirklich schwammspezifisch assoziierte Mikroben im Mesohyl handelt.

### 5.1.3 Korrelation zwischen Bakterienhaltigkeit und Schwammtaxonomie

Beim Vergleich der Bakterienhaltigkeit und der taxonomischen Einordnung der Schwämme ergibt sich ein differenziertes Muster (Zusammenfassung eigener Ergebnisse und der in Hentschel et al. 2003 zitierten Literaturstellen). Einige Ordnungen scheinen stets bakterienhaltige Arten zusammenzufassen, so die *Verongida* (8 Spezies), *Agelasida* (6 Spezies), *Chondrosida* (1 Spezies) und „*Lithistida*“ (1 Spezies). Für andere Ordnungen, wie die *Poecilosclerida* (8 Spezies) und *Halichondrida* (8 Spezies), sind bislang nur bakterienarme Spezies beschrieben worden. Die Ordnungen *Astrophorida* (2 Spezies), *Dictyoceratida* (6 Spezies), *Hadromerida* (3 Spezies), *Haplosclerida* (7 Spezies) und

*Homosclerophorida* (2 Spezies) enthalten sowohl bakterienhaltige, als auch bakterienarme Vertreter. Zukünftige Untersuchungen scheinen insbesondere an den letztgenannten, gemischt zusammengesetzten Ordnungen interessant, da hier vertiefte Kenntnisse über die Verteilungsmuster erhalten werden können. Bei der Beschreibung von Mustern muss jedoch beachtet werden, dass die bislang geltende taxonomische Einteilung der *Porifera* (zu Grunde gelegt wurde hier Hooper & Van Soest 2002) umstritten ist. Molekulargenetische Untersuchungen legen eine zum Teil grundlegende Veränderung der bestehenden Taxonomie nahe (Borchiellini et al. 2001).

#### **5.1.4 Anatomische Aspekte der Bakterienhaltigkeit**

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der verschiedenen Schwammgewebe wurden anatomische Unterschiede zwischen bakterienhaltigen und bakterienarmen Spezies beobachtet. Ein allgemeines Charakteristikum des Gewebes der bakterienhaltigen Schwämme ist die geordnete Strukturierung mit einer kontinuierlichen Begrenzung des Mesohyls durch Pinacozyten oder Choanozyten, die eine epithelartige Zellschicht bilden. Bei bakterienarmen Schwämmen waren diese Zellschichten oftmals nur fragmentarisch sichtbar, was auf Präparationsartefakte zurückgeführt wurde. Mikroskopische Belege für rigide Zell-Zell-Verbindungen, die gewöhnlicherweise bei Epithelien ausgebildet sind, konnten weder bei bakterienhaltigen noch bei bakterienarmen Schwämmen beobachtet werden. Dies stimmt mit anderen mikroskopischen Untersuchungen überein (Lethias et al. 1983), obwohl molekulargenetische Untersuchungen auf das Vorliegen von „tight junctions“ hinweisen (Adell et al. 2004). Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob echte funktionelle Epithelien ausgebildet sind und ob die möglicherweise fragilen „tight junctions“ bei der Gewebepräparation zerstört wurden. Die bakterienhaltigen Schwämme wiesen mikroskopisch einen geordneten Gewebeaufbau mit einer klaren Untergliederung in Mesohyl, Wasserkanäle und Choanozytenkammern auf. Die konsequente Gewebegliederung scheint mit der hohen Anzahl von Mikroben in der Mesohylmatrix zu korrelieren. Die Einbettung von rigiden Bakterienzellen mit oftmals dicken Zellwänden in die gelartige ECM dürfte zu einer erhöhten Steifigkeit bei gleichzeitiger Elastizität führen. Schwammzellen scheinen durch diese verfestigte ECM an ihrem Ort gut fixiert zu sein, jedoch behindert der hohe Gehalt an Symbionten wahrscheinlich auch die Motilität der Zellen (Reiswig 1971 II).

Bei bakterienarmen Schwämmen sind meist große Bereiche des Mesohyls homogen mit ECM gefüllt. Die Dichte der Schwammzellen war hier ebenso wie bei den bakterienhaltigen Vertretern gering. Kollagenfasern waren nur vereinzelt elektronenmikroskopisch sichtbar. Die Stabilisierung des sehr weichen Mesohyls erfolgt bei bakterienarmen Schwämmen durch ein oftmals sehr massiv ausgebildetes Stützgerüst aus Sponginfaser (z. B. *Niphates* sp., *Callyspongia* sp.) oder Spiculae (z. B. *Tethya* sp.), die dem Schwammkörper die nötige Festigkeit geben. Gelegentlich wurden Choanozyten, deren Reußenkämme oder Cilien inmitten des Mesohyls beobachtet. Die Zellen waren allseits in die elektronenmikroskopisch sichtbare ECM eingebettet. Das Vorliegen dieser normalerweise in den Choanozytenkammern lokalisierten Zellen wird als Umorganisationsprozess gedeutet. Da das Mesohyl der bakterienarmen Schwämme lediglich mit ECM, Sponginfasern und Spiculae gefüllt ist, scheint eine ungehinderte Zellwanderung begünstigt zu sein (Reiswig 1971 II).

## 5.2 Bakterielle Aufnahme mariner Schwämme

Schwämme haben aufgrund ihrer hohen Filtrationsleistung einen bedeutenden Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung des Habitats (Reiswig 1974). Die Filtrationseffizienz gegenüber marinem Picoplankton ist sehr hoch (Reiswig 1971 II, Pile et al. 1996) und mechanistische Studien zeigen ein Optimum des größenabhängigen Filtrationsprozesses für typisch bakterielle Größen (1 – 3  $\mu\text{m}$ ) (Turon et al. 1997). Innerhalb eines Größenbereichs wird die Filtration der Schwämme für unselektiv gehalten (Ribes et al. 1999). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass bei *Demospongiae* zwei verschiedene Strategien der Filtration verwirklicht sind. Während bakterienarme Schwämme tatsächlich eine gänzlich unselektive Filtration zeigen, wird für bakterienhaltige Schwämme eine selektive, stark verminderte Aufnahme der schwammeigenen Symbionten beobachtet.

### 5.2.1 Auswahl des experimentellen Designs

Zur Untersuchung der bakteriellen Aufnahme wurden Spezies mit weiter Verbreitung im Mittelmeer, hoher Abundanz im Habitat (Brümmer et al. 2003) und hoher Biomasse je Individuum ausgewählt. Als Modellsysteme für bakterienhaltige Arten wurden *A. aerophoba* und *C. reniformis* etabliert. Für beide ist ein hoher Symbiontengehalt belegt (Vacelt 1975, Wilkinson & Vacelet 1979, Friedrich et al. 1999). Als bakterienarme Spezies wurden *D. avara* und *T. aurantium* verwendet (Turon et al. 1997, Ribes et al. 1999). Der Bakteriengehalt der Schwämme wurde elektronenmikroskopisch überprüft und war für die jeweilige Art an allen Untersuchungsstandorten und über den Zeitraum der Studie konstant. Alle vier Schwamm-species haben leicht unterschiedliche Ansprüche an den jeweiligen Standort (Bergbauer & Humberg 1999), kommen an den Sammelstandorten aber auch unmittelbar nebeneinander vor. Aufgrund des gemeinsamen Auftretens im Habitat filtrieren alle untersuchten Spezies Seewasser mit identischer Zusammensetzung des Bakterioplanktons. Die untersuchten Schwämme verfügen über kleine Oscularöffnungen, deshalb war die direkte Probennahme von filtriertem Wasser nicht praktikabel. Für die Experimente wurde ein geschlossenes Inkubationssystem, ähnlich wie von Pile et al. (2003) und Milanese et al. (2003), verwendet und die Veränderung der bakteriellen Zellzahl über die Zeit bestimmt. Die repetitive Filtration des Inkubationswassers führte zu einer exponentiellen Reduktion der Zellzahl über der Zeit. Diese Filtercharakteristik galt für einen Konzentrationsbereich von

mindestens 4 log-Stufen und erst bei Konzentrationen unterhalb von  $\sim 10^2$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden keine relevanten Messwerte mehr erhalten. Die hier verwendete Methode der Berechnung der Filtrationsraten bietet gegenüber anderen Verfahren folgende Vorteile: I) durch die Bestimmung zahlreicher Messwerte über den gesamten experimentellen Zeitverlauf kann der Bereich der exponentiellen Filtration zeitlich genau definiert werden, II) durch die Beschränkung des Zeitintervalls auf den exponentiellen Filtrationsbereich werden artifiziell zu niedrige Filtrationsraten vermieden, III) durch die Integration mehrerer Messwerte innerhalb des Zeitintervalls werden präzise Ergebnisse erhalten, IV) die berechneten Ergebnisse sind exakt und können zur Berechnung einer Kurve verwendet werden, die der Trendlinie der echten Versuchsdaten entspricht, V) die Filtrationsrate gibt die Zahl der aufgenommenen Bakterienzellen an, dadurch können die Ergebnisse unmittelbar für weitere Berechnungen, wie z. B. aufgenommene C- und N-Menge verwendet werden, VI) die Filtrationsraten können mit den oftmals verwendeten Werten der „clearance-rate“ verglichen werden. Dazu wird der Werte der Filtrationsrate durch die standardisierte bakterielle Anfangskonzentration ( $C_0 = 1 \times 10^5$  Bakterien  $\text{ml}^{-1}$ ) dividiert, es resultiert die sogenannte „clearance-rate“ mit der Dimension:  $\text{ml g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

## 5.2.2 Bakterienhaltige Schwämme

### 5.2.2.1 Aufnahme mariner Bakterienisolate

Zur Untersuchung des bakteriellen Filtrationsmechanismus wurde die Aufnahme verschiedener bakterieller Isolate an *A. aerophoba* getestet. Die Isolate waren ursprünglich (mit Ausnahme von *Pirellula marina* DSM 3645, einem Brackwasserisolat) von *A. aerophoba* und *A. fistularis* isoliert worden (Hentschel et al. 2001, Pimentel-Elardo et al. 2003). Trotz der Isolation der Bakterien vom Schwammgewebe zählen diese nicht zum schwammspezifischen mikrobiellen Konsortium, sie werden als unspezifisch assoziierte Mikroben oder „Futterbakterien“ klassifiziert. Die Filtrationseffizienz mariner Schwämme zeigt eine Abhängigkeit von der Partikelgröße (Turon et al. 1997, Witte et al. 1997). Aufgrund dessen war die Zellgröße der getesteten Isolate elektronenmikroskopisch bestimmt worden (Wehrl 2001). Sie lag für alle Stämme in dem für Bakterien typischen Bereich (1,1 - 2,0  $\mu\text{m}$ ). Diese Zellgrößen entsprechen der von Schwämmen mit hoher Effizienz filtrierte Partikelgröße (Reiswig 1971 II, Ribes et al. 1999).

Alle Isolate wurden von *A. aerophoba* mit hoher Effizienz aufgenommen, eine Beeinflussung durch Sekundärstoffe konnte ausgeschlossen werden. Die normalisierten Filtrationsraten aller sechs Isolate zeigten vergleichbar hohe Werte mit lediglich etwa 1,5-fachem Unterschied. Das  $\alpha$ -Proteobakterium SB89 zeigte keine außergewöhnlich veränderten Filtrationsraten. Von diesem Stamm sind nah verwandte Vertreter bekannt, die von verschiedenen marinen Schwämmen isoliert werden konnten (Olsen et al. 2002) und deren Vorliegen im Schwammgewebe von *Rhopaloeides odorabile* spezifisch nachgewiesen wurde (Webster & Hill 2001). *A. aerophoba* nimmt dieses Alphaproteobakterium jedoch undifferenziert und mit gleichartig hoher Effizienz wie andere funktionelle „Futterbakterien“ auf.

Die getesteten Isolate verfügen über unterschiedlich aufgebaute Zellwände. *Vibrio* sp. SB 177, *Pseudoalteromonas* sp. SB200 und  $\alpha$ -Proteobakterium SB89 verfügen über eine Zellwand vom Gram-negativen Typ. Die äußere Membran setzt sich aus Lipopolysacchariden (LPS), Lipoproteinen und Proteinen zusammen. Im Gegensatz dazu hat der marine *Bacillus* sp. SB144 einen typisch Gram-positiven Zellwandwandaufbau. Der aus Peptidoglycan bestehende Mureinsacculus ist sehr massiv ausgebildet. Die beiden Planctomyceten verfügen über eine Proteinzellwand, die völlig frei von Peptidoglycan ist (Fuerst 1995, 2005). Aufgrund der undifferenzierten und gleichartig hohen Aufnahme aller Isolate wird geschlossen, dass der unterschiedliche Zellwandaufbau keinen Einfluss auf den Filtrationsmechanismus hat.

Eine stark exponierte Zelloberflächenstruktur ist die bakterielle Flagelle. An hyper- und unflagellierten *Vibrio fischeri*-Mutanten wurde deren Einfluss auf die bakterielle Aufnahme untersucht. Der Vergleich beider Mutanten ergab keinen Hinweis auf einen Einfluss der Flagellierung auf den Aufnahmeprozess. Die Erkennung von Zelloberflächen erfolgt oftmals unter Beteiligung von Kohlenhydratresten und spielt bei zahlreichen Adhärenz- und Phagozytoseprozessen eine wichtige Rolle (Wilson et al. 2002). Um den Einfluss auf die bakterielle Filtration zu untersuchen, wurden kompetitive Inhibitionsstudien durchgeführt. Es wurde die Aufnahme von *Vibrio* sp. SB177 bei gleichzeitiger Inkubation mit Kohlenhydraten im Inkubationswasser gemessen. Bei Anwesenheit von D(-)-Fructose wurde eine statistisch signifikante Reduktion der Filtrationsrate um den Faktor 1,4 beobachtet. Aus den Ergebnissen kann noch nicht auf eine unmittelbare Beteiligung von Kohlenhydraten oder deren Rezeptoren auf den Aufnahmeprozess geschlossen werden, da für marine Schwämme die direkte Aufnahme von gelösten Substanzen nachgewiesen ist (Wilkinson & Garrone 1980). Aus diesem Grund könnte die Fructose von den Schwämmen direkt aufgenommen und



verstoffwechselt werden, was eine indirekte Beeinflussung der bakteriellen Aufnahme verursachen könnte. Ein Einfluss von gelösten Kohlenhydraten auf die bakterielle Filtration ist bislang unbeschrieben und beteiligte Mechanismen sind unbekannt, sodass sich hier Potential für weitere Untersuchungen des Aufnahmemechanismus ergibt.

### **5.2.2.2 Aufnahme des Seewasserkonsortiums**

Die Filtration des marinen Bakterioplanktons wurde an angereichertem Seewasser untersucht. *A. aerophoba* zeigte für dieses mikrobielle Konsortium Filtrationsraten, die, verglichen mit den bakteriellen Isolaten, im unteren Bereich lagen. Statistisch liegen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Seewasserkonsortium und der Gruppe der bakteriellen Isolate vor. Die Ergebnisse zeigen, dass der Filtrationsprozess nicht zwischen monoklonal vorliegenden Bakterienzellen und bakteriellen Konsortien zu unterscheiden vermag. Auch komplexe Gemische von bislang nicht kultivierbaren marinen Bakterien werden undifferenziert mit hoher Effizienz aufgenommen. Sowohl bakterielle Isolate als auch das Seewasserkonsortium können zu einer funktionellen Gruppe der effizient aufgenommenen „Futterbakterien“ zusammengefasst werden.

### **5.2.2.3 Aufnahme des Symbiontenkonsortiums**

Schwammsymbionten stellen ebenso wie das Seewasserkonsortium ein sehr komplex und phylogenetisch heterogen aufgebautes bakterielles Konsortium dar. Im Gegensatz zur Gruppe der „Futterbakterien“ wurden Symbionten jedoch mit sehr stark verminderter Effizienz aufgenommen. Die um fast zwei log-Stufen verminderten Filtrationsraten belegen, dass ein spezifischer, selektiver Filtrationsmechanismus existieren muss, der dafür verantwortlich ist, dass bakterienhaltige Schwämme ihre eigenen Symbionten nicht aufzunehmen vermögen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen die von Wilkinson et al. (1984) formulierte Hypothese einer selektiven Filtration mariner Schwämme. Gleichzeitig werden die Ergebnisse aufgrund verfügbarer neuer Techniken und Kenntnisse präzisiert, quantifiziert und weitere Schwammspezies einbezogen, um generelle Muster formulieren zu können.

Frühere Diversitätsstudien waren auf die Isolierbarkeit und numerisch-taxonomische Analyse der physiologischen Fähigkeiten angewiesen. So beschrieben Wilkinson et al. (1981) mehrere Gruppen von Bakterien, darunter auch Isolate von *A. aerophoba* und *A. cavernicola*, die im Vergleich zu Seewasserbakterien aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften als spezifisch schwammassoziierte Bakterien klassifiziert wurden. Durch Einführung der Molekulargenetik konnten die Kenntnisse über die Diversität des Symbiontenkonsortiums in den letzten Jahren beträchtlich erweitert werden. So werden für *A. aerophoba* schwamm-spezifische Vertreter aus mindestens 10 bakteriellen Phyla oder Subphyla nachgewiesen (Hentschel et al. 2002, Hentschel et al. 2006, Fieseler et al. 2004). Von diesen molekular-genetisch identifizierten Vertretern befindet sich bislang jedoch noch kein Stamm in Kultur. Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden deshalb an dem gesamten, aus *A. aerophoba*-Individuen präparierten Konsortium durchgeführt. Wilkinson et al. (1984) berichteten von einer stark verminderten Aufnahme der schwamm-spezifischen Bakterienisolate ins Gewebe, die aufgrund radioaktiver Markierung mikroskopisch verfolgt werden konnten. An intakten Tieren wurde, verglichen mit typischen Seewasserisolaten, eine stark verlangsamte bakterielle Filtration ermittelt. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass *A. aerophoba* gegenüber seinen eigenen Symbionten eine extrem reduzierte Aufnahme aufwies, die kaum noch messbar war. Für den gleichfalls bakterienhaltigen *C. reniformis* wurde ebenfalls eine extrem verminderte Aufnahme ermittelt. Die Quantifizierung der Selektivität erfolgt über Selektivitätsquotienten, die die Filtrationsraten für Schwammsymbionten mit denen des Modell-„Futterbakteriums“ *Vibrio* sp. SB177 vergleichen. Tabelle 5.2.1 fasst die Selektivitätsquotienten für die untersuchten bakterienhaltigen und bakterienarmen Schwämme zusammen:

**Tab. 5.2.1:** Filtrationsselektivität bakterienhaltiger und bakterienarmer Schwämme. Angegeben sind die Selektivitätsquotienten: ( $r$  (*Vibrio* sp. SB177)  $r^{-1}$  (Symbionten)).

Bakterienhaltige Schwämme		Bakterienarme Schwämme	
<i>A. aerophoba</i>	<i>C. reniformis</i>	<i>D. avara</i>	<i>T. aurantium</i>
33,2	38,1	0,98	1,99

Für die bakterienhaltigen Spezies *A. aerophoba* und *C. reniformis* liegen hohe Selektivitätsquotienten vor, während sich die Quotienten für die bakterienarmen Schwämme im Bereich nahe 1, entsprechend einer unselektiven Filtration, bewegen. Das bei bakterienhaltigen Schwämmen beobachtete Muster der Filtrationsselektivität gegenüber Symbionten ist

statistisch signifikant. Über Wilkinson et al. (1984) hinausgehend zeigen die Ergebnisse an *C. reniformis*, dass nicht nur eine Selektivität gegenüber den arteigenen Symbionten besteht, sondern auch die Konsortien anderer Schwämme (aus *A. aerophoba*) selektiv stark vermindert aufgenommen werden. Die „Erkennung“ eines Symbiontenkonsortiums durch eine andere Schwammspezies unterstützt die These, dass verschiedene Schwammspezies eine einheitliche mikrobielle Signatur von Symbionten aufweisen (Hentschel et al. 2002). Aufgrund des vergleichbar hohen Selektivitätsquotienten wird von einer weitgehenden Übereinstimmung der mikrobiellen Konsortien beider Schwämme ausgegangen.

Die für Schwammsymbionten um fast zwei log-Stufen reduzierten Filtrationsraten belegen, dass die Aufnahme von Symbionten ohne ernährungsphysiologische Relevanz für die Schwämme ist. Die elektronenmikroskopisch gelegentlich im Mesohyl beobachtete Phagozytose von Symbionten wird deshalb eher als Ausnahmeprozess gedeutet, der womöglich der Regulation der Symbiontendichte im Gewebe dienen könnte. Die dargestellten Ergebnissen enthalten interessante Hinweise zur Weitergabe der Symbionten. Zur Diskussion steht, ob auch ein horizontaler Transfer von Symbionten zwischen adulten Individuen stattfinden könnte. Bei einem solchen Szenario wird davon ausgegangen, dass Symbiontenzellen ins Seewasser gelangen, die von anderen Schwammindividuen ausgefiltert werden könnten und in diesen eine Symbiontenpopulation aufbauen könnten (Hill 2004). Diese Hypothese erscheint zunächst vielversprechend aufgrund der hohen Volumenpumpraten ausgewählter Schwammspezies (Reiswig 1974) und der hohen Filtrationseffizienz (Reiswig 1971 II, Pile et al. 1996, Ribes et al. 1999). Jedoch erscheint dieser Verbreitungsweg eher unwahrscheinlich für die hier untersuchten bakterienhaltigen Spezies. Diese zeigen eine artspezifisch wesentlich geringere Volumenpumpleistung, die in Kombination mit der extrem reduzierten Filtrationseffizienz gegenüber Symbiontenzellen die Aufnahme dieser aus dem umgebenden Seewasser unwahrscheinlich erscheinen lässt. Sollte trotzdem eine sporadische Aufnahme erfolgen, würde die postulierte Verdauungsresistenz der Symbionten wahrscheinlich wieder zu einer Abgabe ins Wasser führen (Reiswig 1971 I, Turon et al. 1997). Im Gegensatz zur kontrovers diskutierten Hypothese des horizontalen Transfers konnte die vertikale Weitergabe bei ausgewählten bakterienhaltigen Schwämmen gezeigt werden. Elektronenmikroskopisch wurden verschiedene bakterielle Morphotypen in Reproduktionsstadien der bakterienhaltigen Schwämme nachgewiesen (Levi & Levi 1976, Kaye 1991, Sciscioli et al. 1991, Usher et al. 2001, Usher et al. 2005, Wehrl in Vorbereitung). Der vertikale Transfer dürfte deshalb den favorisierten Weg der Weitergabe des komplexen Symbiontenkonsortiums darstellen.

Der Mechanismus der selektiven bakteriellen Filtration mariner Schwämme ist bisher kaum untersucht. Mit Ausnahme von Wilkinson et al. (1984) wurde generell davon ausgegangen, dass die Filtration ein unspezifischer Prozess sei, durch den alle Bakterienzellen, aber auch abiotische Partikel wie Latex Beads (Turon et al. 1997, Witte et al. 1997) oder Tuschepartikel (Kilian 1952, 1964) aufgenommen werden. Unterschiedliche Filtrationseffizienzen wurden nur für Partikel oder Planktonfraktionen mit stark unterschiedlicher Größe ermittelt. Die Symbiontenzellen weisen jedoch eine typische bakterielle Zellgröße auf und unterscheiden sich mechanisch nicht von den getesteten bakteriellen Isolaten. Die Symbionten müssen deshalb, ebenso wie andere Bakterienzellen, in das Wasserkanalsystem der Schwämme gelangen können. Eine effiziente Aufnahme der Symbionten durch Choanozyten mit einer nachfolgenden Wiederfreisetzung, bedingt z. B. durch Unverdaulichkeit oder blockierte Transzytose ins Mesohyl, erscheint unwahrscheinlich. Hier würde zunächst eine initiale Reduktion der Zellzahl messbar sein, bevor durch das Gleichgewicht von Aufnahme und Abgabe eine konstante Zellzahl über die Zeit erscheinen würde. Eine Aufnahme von Symbionten widerspräche auch den mikroskopischen Untersuchungen von Wilkinson (et al. 1984) und dieser Arbeit (Kap. 4.5).

Die Ergebnisse implizieren, dass das Phänomen der Filtrationsselektivität ein initialer, am Choanoderm erfolgreicher Prozess ist, der den Symbionten die ungehinderte Passage durch das Wasserkanalsystem und die Choanozytenkammern mit den Reußenapparaten ermöglicht. Als mögliche Faktoren für die verminderte Aufnahme wurden spezielle bakterielle Oberflächenstrukturen, wie Kapseln und Schleime diskutiert, die für die „Maskierung“ der Symbionten verantwortlich sein könnten. Ebenso könnten schwammeigene Faktoren aus der ECM auf der Oberfläche der Symbionten aufgelagert sein, die vom distalen Pol der Choanozyten nicht erkannt werden könnten (Wilkinson et al. 1984). Diese für die Symbionten postulierten „Maskierungs“-Faktoren vermitteln jedoch keine generelle Aufnahmeresistenz wie durch die vergleichenden Untersuchungen an den bakterienarmen Schwämmen gezeigt werden konnte. Diese Spezies nehmen Symbiontenzellen undifferenziert und im gleichen Maß wie typische „Futterbakterien“ auf. Aufgrund der prinzipiell möglichen Aufnahme der Symbionten wird das beschriebene Phänomen weniger als „Aufnahmeresistenz“ der Symbionten, sondern vielmehr als „Aufnahmedefizienz“ der bakterienhaltigen Schwämme gedeutet. Die an der verminderten Aufnahme beteiligten Faktoren und Mechanismen sind bei bakterienhaltigen Schwämmen wahrscheinlich universell verbreitet und stellen vermutlich das grundlegende Kriterium für die Ausbildung der Symbiontenpopulation im Mesohyl dar.

### 5.2.3 Bakterienarme Schwämme

Diese Spezies zeigten ebenso wie die bakterienhaltigen Schwämme eine vergleichbar hohe bakterielle Filtrationsleistung. Beide Schwammgruppen unterschieden sich jedoch eklatant im Mechanismus der Filtration. Die bakterienarmen Schwämme wiesen eine vollkommen unspezifische Filtration gegenüber allen Bakterien, inklusiv dem Symbiontenkonsortium, auf. Diese wurden mit fast identischer Effizienz wie „Futterbakterien“ aufgenommen, was sich in den ermittelten Selektivitätsquotienten widerspiegelt, die Werte um 1 haben. (Tab. 5.2.1). Die Unterschiede der jeweiligen Filtrationsraten waren klein und statistisch nicht signifikant. Die Symbionten wurden nicht nur mit hoher Effizienz aufgenommen, sie wurden auch in gleichartiger Weise wie „Futterbakterien“ prozessiert (Kap. 4.5). Das artkonstante Fehlen eines komplexen Symbiontenkonsortiums belegt, dass bei diesen Schwämmen ein horizontaler Transfer von Bakterien keine Rolle spielt. Gleichwohl die Filtrationsraten sehr hoch sind, kommt es unter natürlichen Bedingungen nie zur Etablierung einer Symbiose. Die vermutlich hocheffiziente Degradierung aufgenommener Bakterienzellen bedingt, dass keine lebenden Symbionten ins Mesohyl der Schwämme gelangen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit können nun zwei funktionelle Gruppen von Schwämmen definiert werden. Bakterienhaltige Schwämme sind ein ideales Modellsystem zur Untersuchung wahrscheinlich weit verbreiteter, universeller Mechanismen der Interaktion zwischen Metazoen und extrazellulärer Endosymbionten. An bakterienarmen Schwämmen lassen sich hingegen die Prozesse der generellen, unselektiven Aufnahme von Bakterien durch Eukaryotenzellen untersuchen. Die Vergleichsmöglichkeit zwischen selektiven und generellen Aufnahmeprozessen bei nah verwandten Schwammarten birgt großes Potential für die zukünftige Aufklärung grundlegender Zell-Zell-Interaktionsmechanismen, die wahrscheinlich universelle Verbreitung in der Natur haben.

## 5.3 Pumpleistung und Allometrie der bakteriellen Filtration

### 5.3.1 Pumpleistung

Der Filtermechanismus der Schwämme entspricht dem Typ des „collar sieving“, der exklusiv nur für *Porifera* bekannt ist (Riisgård & Larsen 2001). Dabei werden sehr hohe Wasservolumina durch den Körper der Tiere gepumpt, die das 23.000 fache Eigenvolumen  $\text{Tag}^{-1}$  überschreiten können (Reiswig 1974). Die Pumpraten verschiedener Schwammspezies unterscheiden sich um mehr als eine Zehnerpotenz (Zusammenstellung in Yahel et al. 2003). Dabei werden unterschiedliche Pumpraten auf die artspezifische Morphologie, Gewebedichte und Mikroarchitektur des Gewebes zurückgeführt (Reiswig 1971 II). In dieser Studie wurde die Pumprate an einem exemplarischen Individuum von *A. aerophoba* anhand der Ausströmgeschwindigkeit des gepumpten Wassers geschätzt. Die hier ermittelte Rate liegt etwa bei dem 760 fachen Eigenvolumen  $\text{Tag}^{-1}$  und damit im unteren Bereich bisher untersuchter Schwammspezies. Der Vergleich der allometriekorrigierten Pumprate mit den aus den Filtrationsraten ableitbaren „clearance rate“-Werten zeigt, dass die verwendete Methode die effektive Pumpleistung unterschätzt. Methodische Ungenauigkeiten stellen bei der Bestimmung von Pumpraten allgemein ein großes Problem dar und konnten auch durch zahlreiche unterschiedliche Methoden (Reiswig 1971 I, Riisgård et al. 1993, Weisz 2006) bislang nicht völlig überwunden werden.

Die im Vergleich mit anderen Schwämmen niedrige Filtrationsrate von *A. aerophoba* ist wahrscheinlich ein artspezifisches Charakteristikum und wird durch mehrere Faktoren bedingt. Ein wichtiger Parameter ist die Bakterienhaltigkeit dieser Spezies, die mit einem kompakten, fleischigen Gewebeaufbau einhergeht. Beim Vergleich unterschiedlicher Schwammspezies innerhalb eines Habitats wurde gezeigt, dass bakterienarme Schwämme charakteristischerweise hohe Pumpraten aufweisen, während bakterienhaltige Spezies vergleichsweise niedrige Pumpraten haben (Reiswig 1974, Weisz 2006). Darüber hinaus hat auch die Temperatur einen Einfluss auf die Pumpleistung (Reiswig 1971 I, Riisgård et al. 1993), sodass für Mittelmeerspezies, verglichen mit tropischen Vertretern, niedrigere Pumpraten erwartet werden müssen. Ferner spielen ökologische Faktoren des Habitats eine Rolle. Zur Deckung des Energiebedarfs muss eine bestimmte Anzahl von Nahrungspartikeln filtrierte werden. Da der Planktongehalt des Mittelmeers den der tropischen Riffe um ein mehrfaches übersteigt (Wilkinson 1987 II), ist damit zu rechnen, dass mediterrane Vertreter

ihren Energiebedarf aus einem wesentlich geringeren Seewasservolumen decken können, was sehr gut mit der ermittelten, vergleichsweise niedrigen Pumpleistung übereinstimmen würde.

### 5.3.2 Allometrie

Durch den Begriff der Allometrie werden bei Organismen empirisch ermittelte Phänomene beschrieben, bei denen eine physiologische Leistung oder Größe keine proportionale Entsprechung zu einer Bezugsgröße, wie der Körpermasse, hat. Die Beziehung beider Größen zueinander wird gewöhnlich durch die Funktion  $f(x) = a \cdot x^b$  ausgedrückt (Kleiber 1932). Allometrien gelten universell für alle Bereiche des Lebens und werden über einen Massenbereich von 21 log-Stufen gefunden (West et al. 1997, West et al. 2002). Die am häufigsten untersuchte Allometrie ist die interspezifische Beziehung von Körpermasse zur Metabolismusrate, für die  $b \approx 0,75$  gilt (West & Brown 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird eine Allometrie zwischen der Filtrationsrate und der Körpermasse von Schwämmen beschrieben. Auch andere Studien belegen eine Allometrie für die bakterielle Filtration (Frost 1980, Riisgård et al. 1993, Ribes et al. 1999), sowie für die Pumpleistung mariner Schwämme (Reisig 1974). Für *A. aerophoba* wurde eine fast vollständige Entkopplung von Körpermasse und Filtrationsleistung ermittelt. Diese außergewöhnlich starke Allometrie wird durch den kleinen allometrischen Exponenten  $b = 0,0321$  ausgedrückt. Bei dem bakterienarmen *D. avara* wurde  $b = 0,2487$  bestimmt. Hier lagen die Filtrationsraten der drei kleinen Individuen (10 - 18 g) deutlich unterhalb der der vier großen Schwämme. Dies könnte auf einen Übergang von Isometrie ( $b = 1$ ) zu Allometrie oder eine komplexe Allometrie hinweisen. Eine komplexe Allometrie liegt vor, wenn für verschiedene Größenbereiche unterschiedliche allometrische Exponenten gelten. Solche Beziehungen wurden bereits für unterschiedliche Größenbereiche oder Entwicklungsstadien anderer mariner Invertebraten beschrieben (Nakaya et al. 2003). Bei *D. avara* kann jedoch aufgrund der geringen Individuenzahl keine sichere Aussage über das mögliche Vorliegen einer komplexen Allometrie getroffen werden.

Die für beide Schwammarten ermittelten allometrischen Exponenten liegen im unteren Bereich oder sogar unterhalb der bisher beschriebenen Exponenten ( $b = 0,15 - 1,28$ ) (Peters 1983). Das Phänomen ist insbesondere unverständlich für Schwammespezies wie *A. aerophoba* und *D. avara*, da Individuen oberhalb einer bestimmten Größe über einen kolonieartigen Habitus mit mehreren Schloten verfügen, was einen quasi-modularen Aufbau

darstellt. Allgemein wird davon ausgegangen, dass modulares Wachstum eine Strategie ist, mit der allometrische Limitierungen des Organismus überwunden werden können (Hughes & Hughes 1986). Ungeachtet der Theorie, wurde auch für andere marine Invertebraten mit modularem Körperaufbau, z. B. Weichkorallen, eine Allometrie beschrieben (Vollmer & Edmunds 2000).

Die möglichen Ursachen der Allometrie bei Schwämmen sind bislang völlig unbekannt. Es wird spekuliert, dass die verminderte Filtrations- und Pumpleistung großer Individuen mit einer Reduktion der Anzahl von Choanozyten oder Choanozytenkammern einhergehen könnte (Riisgård et al. 1993). Darüber hinaus wird auch eine Reduktion des Wasserkanalsystems diskutiert (Ribes et al. 1999). Eine weitere Ursache könnte in einer zunehmenden Umstrukturierung und steigenden Plastizität des Wasserkanalsystems liegen, was ebenfalls zu einer Verminderung der Pump- und Filtrationsleistung führen könnte (Reiswig 1971 II). Diese Parameter sind jedoch bisher experimentell schlecht erfassbar und lassen sich kaum quantifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Untersuchung der zellulären Gewebezusammensetzung bei unterschiedlich großen Individuen geleistet. Hier konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Körpermasse und der Konzentration der Schwammzellen und der Symbionten ermittelt werden. Werden konstante Zellvolumina bei Schwammzellen und Symbionten vorausgesetzt, bedeutet dies, dass mit steigender Schwammmasse die eukaryotische und die prokaryotische Biomasse proportional zunimmt. Unter dem Gesichtspunkt der starken Allometrie der bakteriellen Filtration impliziert dies, dass bei großen Individuen proportional weniger Nahrungspartikel und  $O_2$  zur Verfügung stehen. Große Individuen sollten deshalb einen verminderten Metabolismus aufweisen. Es bleibt spekulativ, ob dies bei bakterienhaltigen Schwämmen ein Mechanismus darstellen könnte, mit dem die Symbiontenpopulation im Mesohyl reguliert wird.



## 5.4 Analyse der Aufnahme von mikrobiellen Konsortien mittels DGGE

Bakterienhaltige Schwämme nehmen das Konsortium der Seewasserbakterien effizient auf, während das Symbiontenkonsortium praktisch nicht ausfiltriert wird. Beide Konsortien sind komplex und phylogenetisch hoch divers zusammengesetzt und enthalten Vertreter aus zahlreichen bakteriellen Phyla oder Subphyla. Um vertiefte Einblicke in den Mechanismus der bakteriellen Aufnahme zu erhalten, wurde untersucht, ob einzelne phylogenetische Linien der Konsortien unterschiedlich stark aufgenommen werden. Die verwendete Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) erlaubte, verschiedene bakterielle Vertreter der Konsortien nachzuweisen und deren Abundanz anhand der Bandenstärke qualitativ beurteilen zu können. Durch Sequenzierung der Banden erfolgte die taxonomische Identifizierung der jeweiligen OTU's.

### 5.4.1 DGGE-Analyse des bakteriellen Seewasserkonsortiums

Die für das Seewasserkonsortium ermittelte starke Aufnahme spiegelte sich bei der phylogenetischen Analyse des Konsortiums wider. In den DGGE-Gelen wurde für fast alle Phylotypen eine Reduktion der Bandenstärke nachgewiesen. Um ein Muster der phylogenetischen Veränderung des Konsortiums formulieren zu können, wurden die Banden als „verschwindend“, „reduziert“ oder „konstant“ klassifiziert. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Bandengruppen am Konsortium sind in Tabelle 5.4.1 zusammengefasst.

**Tab. 5.4.1:** Analyse der phylogenetischen Veränderung von bakteriellen Konsortien bedingt durch die Filtrationsaktivität von *A. aerophoba*. Klassifizierung von DGGE-Banden als „verschwindend“, „reduziert“ und „konstant“. Angegeben sind die prozentualen Anteile jeder Bandenklasse an der Gesamtbandenzahl (Symbionten n = 65, Seewasserkonsortium n = 40)

Konsortium	Klassifizierung der Banden (%)		
	verschwindend	reduziert	konstant
Seewasser	52	45	3
Symbionten	25	29	46

Lediglich ein marines Alphaproteobakterium wurde nicht oder sehr schwach aus dem Wasser aufgenommen. Alle weiteren Phylotypen zeigten eine starke Aufnahme, mehr als die Hälfte von ihnen war am Ende des Experiments nicht mehr nachweisbar. Hierzu zählte auch eine OTU, die ein Vertreter des Symbiontenkonsortiums ist und die vermutlich aus den Versuchsschwämmen ausgewaschen wurde. Alle übrigen untersuchten OTU's stammten aus dem Subphylum *Gammaproteobacteria*. Dieses Subphylum ist mit marinen Vertretern der Gattungen *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* und *Alteromonas* eine typische Komponente des Seewassers (Eilers et al. 2002 I). Die starke Abundanz von *Gammaproteobacteria* kann eine spezielle Eigenschaft des verwendeten küstennahen Seewassers sein oder auch durch die Anreicherung beeinflusst worden sein (Eilers et al. 2000 II). Das Vorliegen zahlreicher Phylotypen, die mit unkultivierten Vertretern verwandt sind, deutet auf die komplexe Zusammensetzung und bislang unzureichende Kultivierbarkeit des Konsortiums hin. Die weitgehend einheitliche Aufnahme der unterschiedlichen Phylotypen bestätigt den Mechanismus der unselektiven Aufnahme von „Futterbakterien“.

#### 5.4.2 DGGE-Analyse des Symbiontenkonsortiums

Das Symbiontenkonsortium von *A. aerophoba* wies eine 1,6-fach höhere Anzahl von Banden als das Seewasserkonsortium auf. Die Sequenzierung ausgewählter OTU's bestätigte die komplexe Zusammensetzung des Konsortiums. Die 25 untersuchten OTU's konnten sechs bakteriellen Subphyla / Phyla zugeordnet werden, die charakteristische Komponenten des Konsortiums von *A. aerophoba* sind (Hentschel et al. 2002).

Die Analyse der phylogenetischen Zusammensetzung während der bakteriellen Filtration enthüllte, dass ein hoher Anteil der Phylotypen nicht aufgenommen wurde (Tab. 5.4.1). Lediglich eine geringe Anzahl von Banden wurde als verschwindend klassifiziert. Diese wiesen von Beginn an eine geringe Stärke auf, was auf eine geringe Abundanz der bakteriellen Vertreter im Konsortium deutete. Die qualitative, phylogeniebezogene Untersuchung unterstützt die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung insofern, als dass die stark verminderte Aufnahme des Konsortiums mit einem hohen Anteil „konstanter“ Banden korreliert ist. Beim Vergleich aller Sequenzen zeigt sich, dass Vertreter eines bakteriellen Phylums in ganz unterschiedlichen Bandengruppen vertreten sind. So wurden z. B. Sequenzen des Phylums *Chloroflexi* in allen drei Bandengruppen gefunden. Die entsprechenden Phylotypen zeigten nahe Verwandtschaft zu den jeweiligen *A. aerophoba*-Klonen TK79 und

TK32. Ebenso waren Vertreter der *Cyanobacteria* als „konstante“ und „reduzierte“ OTU's vertreten, die jeweils als nächsten Verwandten den *A. aerophoba*-Klon TK09 hatten.

Aufgrund der DGGE-Studie wird geschlossen, dass bakterienhaltige Schwämme nicht zwischen individuellen phylogenetischen Linien eines Konsortiums zu differenzieren vermögen. Da für einzelne phylogenetische Linien sowohl aufgenommene als auch nicht aufgenommene Phylotypen gefunden wurden, wird gefolgert, dass die Eigenschaften, die zu einer verminderten oder gänzlich mangelnden Aufnahme führen, in ganz unterschiedlichen bakteriellen Phyla vorhanden sind und so die phylogenetisch komplexe Zusammensetzung des Konsortiums ermöglichen.

## 5.5 Prozessierung von Partikeln und Bakterien in der Mesohylmatrix

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beschrieben werden, dass bakterienhaltige und bakterienarme Schwämme über zwei unterschiedliche Mechanismen der bakteriellen Aufnahme verfügen. Daraus ergibt sich die weiterführende Frage, ob diese beiden Schwammgruppen auch Unterschiede in der internen Prozessierung aufgenommener Bakterien aufweisen.

### 5.5.1 Aufnahme und Prozessierung von Latex Beads

Untersuchungen von Phagozytoseprozessen werden häufig an inerten Latex Beads durchgeführt, da aufgrund ihrer Unverdaulichkeit die Aufnahme und interne Prozessierung mikroskopisch verfolgt werden kann (Desjardins & Griffiths 2003). In der vorliegenden Studie zeigten die beiden untersuchten Modellorganismen *A. aerophoba* und *D. avara* eine effiziente und schnelle Aufnahme von Latex Beads. Durch mikroskopische Untersuchung des Mesohyls konnten zwei verschiedene Mechanismen der Prozessierung beschrieben werden. Beim bakterienhaltigen *A. aerophoba* erfolgte die Partikelaufnahme nach einem komplexen, geordneten Mechanismus. Im Gewebe wurden charakteristische, große Aggregate gefunden, die aus schätzungsweise mehr als 100 Beads bestanden. Der Durchmesser der Aggregate überstieg die Größe typischer Mesohylzellen um den Faktor 3 – 5. Diese Beads-Aggregate wurden in tiefere Mesohylbereiche transportiert, wo nachfolgend die Weitergabe einzelner Beads oder kleiner Gruppen an andere Mesohylzellen erfolgte. Im Vergleich zu bakterienarmen Schwämmen erschien der Transport der Aggregate durch das Mesohyl langsamer zu erfolgen, was in guter Übereinstimmung mit anderen Berichten ist (Reiswig 1971 II). Die Beobachtung von konzentrischen Ringstrukturen aufgenommener Beads-Aggregate deutete auf eine periodische Aufnahme von Partikeln hin und könnte insofern mit dem Transportmechanismus in Zusammenhang stehen, als während der Formierung der Aggregate vermutlich keine Aufnahme weiterer Partikel stattfindet. Die Detailuntersuchung der Beads-Aggregate ergab, dass diese durch eng zusammenliegende Schwammzellgruppen gebildet werden. Jede einzelne Schwammzelle konnte bis zu mindestens 10 Nahrungspartikel enthalten und interagierte über lange Zellfortsätze mit anderen Zellen der Gruppe. Aufgrund der funktionellen Spezialisierung dieser Zellen auf den Partikeltransport, der sterischen Nähe und Interaktion untereinander, werden diese speziellen Zellgruppen als „wolf packs“

bezeichnet. Extrazellulär in der ECM vorliegende Beads konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt gefunden werden, offensichtlich werden auch unverdauliche und inerte Partikel wie Latex Beads strikt intrazellulär gehandhabt. Es könnte sich hier um einen speziellen Mechanismus bakterienhaltiger Schwämme handeln, der dem Schutz der Symbiontenpopulation dienen könnte, indem das Eindringen von Mikroben in das Mesohyl verhindert wird. Der Mechanismus des Transports und der internen Prozessierung bei bakterienhaltigen Schwämmen wird als komplex beurteilt, da eine gezielte Weitergabe einzelner Nahrungspartikel von Choanozyten / Pinacozyten an die funktionell spezialisierten „wolf pack“-Zellen erfolgen muß, die ihrerseits die Partikel durch das Mesohyl transportieren und an andere Schwammzellen weitergeben.

Der bakterienarme *D. avara* zeigte eine sehr schnelle Verteilung der Beads im gesamten Mesohyl. Bedingt durch die Mikroarchitektur des Gewebes liegen benachbarte Wasserkanäle oder Choanozytenkammern sehr nahe beieinander, sodass nur kurze Transportstrecken auftreten. Darüber hinaus erlaubt vermutlich das überwiegend aus ECM bestehende Mesohyl die schnelle und ungehinderte Wanderung von Schwammzellen (Reiswig 1971 II). Das Vorliegen einzelner, gleichförmig verteilter Beads deutete darauf hin, dass jede Schwammzelle nur ein, oder eine sehr geringe Anzahl, Partikel aufnahm. Das beobachtete Verteilungsmuster ist konform mit anderen Ergebnissen an bakterienarmen Schwammspezies (Turon et al. 1997). Da keine Anhäufungen von Beads beobachtet wurden, wird gefolgert, dass der Transport nicht über spezialisierte Zellen mit Verteilerfunktion erfolgen kann. Nach 300 Minuten Inkubation konnte keine Kolo-kalisation von Beads und Schwammzellen beobachtet werden. Offensichtlich werden Nahrungspartikel nicht nur schnell durch das Mesohyl transportiert, sondern auch, wie im Fall der unverdaulichen Latex Beads, schnell in die ECM sezerniert.

### **5.5.2 Aufnahme und Prozessierung von „Futterbakterien“ und Symbionten**

Zur Untersuchung der Prozessierung aufgenommener „Futterbakterien“ wurde der GFP-markierte Stamm *Vibrio* sp. MMW1 konstruiert. Dieser ist ein Derivat des wildtypischen *Vibrio* sp. SB177, der aufgrund zahlreicher quantitativer Filtrationsexperimente gut charakterisiert ist. Bei der mikroskopischen Untersuchung von *A. aerophoba* konnten die GFP-markierten Zellen im Gewebe in unmittelbarer Nähe zum wasserführenden System nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei Latex Beads wurden große Aggregate aus zahlreichen

Bakterienzellen beobachtet. In tieferen Mesohylbereichen konnten keine fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Löschung der Fluoreszenz kurze Zeit nach der Aufnahme aus dem Wasser deutete auf einen schnellen und effizienten Abbau der markierten Zellen, einhergehend mit einer Proteolyse des GFP's, hin. Die Untersuchung bestätigte, dass bei bakterienhaltigen Schwämmen der Transport aufgenommener Partikel immer in Form von Aggregaten erfolgt, unabhängig von der Natur oder der Verdaulichkeit der Partikel. Darüber hinaus sind die beschriebenen Schwammzellgruppen nicht nur für den Transport zuständig, sie müssen auch bei der Lyse der Bakterienzellen unmittelbar nach Bildung der Aggregate involviert sein.

Neben dem „Futterbakterium“ *Vibrio* sp. MMW1 wurde die Prozessierung des Symbiontenkonsortiums untersucht. Aufgrund der bislang mangelnden Kultivierbarkeit und Manipulierbarkeit der Symbionten wurden die Zellen durch eine unspezifische Lebendfärbung mit Rhodamin markiert. Der Farbstoff beeinträchtigt weder die Lebensfähigkeit der Zellen noch die Adhärenzeigenschaften (Fuller et al. 2000). Bei *A. aerophoba* konnten mikroskopisch keine Symbiontenzellen im Gewebe nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den ermittelten stark reduzierten Filtrationsraten (Kap. 4.2). Bei *D. avara* hingegen wurde eine große Anzahl aufgenommener Symbionten im Mesohyl nachgewiesen. Ähnlich wie bei Latex Beads erfolgte die Aufnahme und der Transport der Symbionten sehr schnell. Durch die vergleichende mikroskopische Untersuchung wurde bestätigt, dass bakterienhaltige Schwämme nicht in der Lage sind, Symbiontenzellen aus dem Seewasser aufzunehmen und im Gewebe zu prozessieren, während bakterienarme Schwämme Symbionten genauso wie „Futterbakterien“ aufnehmen und in das Mesohyl transportieren können.

## 5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Schwämme verschiedene Muster der Bakterienhaltigkeit aufweisen. Ein interessanter zukünftiger Ansatz wäre die Untersuchung der Bakterienhaltigkeit bei weiteren Schwämmen aus den sogenannten gemischten Ordnungen, die bakterienhaltige und bakterienarme Spezies enthalten. Der Vergleich von möglichst nah verwandten symbiontenhaltigen und symbiontenfreien Schwammspezies könnte wichtige Hinweise auf allgemeine Symbiosemechanismen liefern. Durch den Vergleich von DNA-Sequenzen dieser Schwämme, die für die molekulare Datierung („molecular clock“) geeignet sind, könnten möglicherweise neue Hinweise auf das Alter von Symbiosen erhalten werden.

Diese Arbeit beschreibt bei bakterienhaltigen Schwämmen den Mechanismus der bakteriellen Zellerkennung, der die Unterscheidung zwischen Symbionten und „Futterbakterien“ ermöglicht. Für die weitere Untersuchung wäre es vorteilhaft, wenn anstatt der komplexen Symbiontenkonsortien kultivierbare Vertreter der Symbionten zur Verfügung stehen würden. Ebenfalls geeignet wären Isolate, die funktionell genauso wie die Symbionten von den Schwämmen nicht aufgenommen werden. Um solche Isolate zu erhalten, könnte die Aufnahme von kultivierbaren Vertretern aus den typischen Symbiontenphyla getestet werden. Sollte ein „nicht-filtrierbares“ Isolat ermittelt werden, könnte die bakterielle Zellwandbeschaffenheit durch biochemische Methoden untersucht werden und mit den zur Verfügung stehenden „Futterbakterien“ verglichen werden. Ferner könnten die in dieser Arbeit begonnenen Versuche zum enzymatischen Abbau bakterieller Zellwandproteine weiter aufgegriffen werden. Ergebnisse versprechen nicht nur Experimente mit weiteren Proteasen, auch eine Behandlung mit Chelatoren, kohlenhydratspaltenden Enzymen und Detergenzien scheinen interessant. Dabei müssen jedoch Methoden erarbeitet werden, um die Regeneration der natürlichen Zellwand bei kultivierbaren Bakterienzellen zu unterbinden. Sollten diese Versuche zu einer Veränderung der bakteriellen Aufnahme führen, können die beteiligten Faktoren wahrscheinlich relativ einfach durch Isolation aus dem wässrigen Behandlungsüberstand isoliert und weiter charakterisiert werden.





## 6 Literaturverzeichnis

**Adell T., Gamulin V., Perovic-Ottstadt S., Wiens M., Korzhev M., Müller I.M., Müller W.E.G., 2004:** Evolution of metazoan cell junction proteins: the scaffold protein MAGI and the transmembrane receptor tetraspanin in the demosponge *Suberites domuncula*. *J. Mol. Evol.* **59(1)**: 41 - 50

**Akiyama S.K., Johnson M.D., 1983:** Fibronectin in evolution: presence in invertebrates and isolation from *Microciona prolifera*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **76(4)**: 687 - 694

**Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997:** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25(17)**: 3389 - 3402

**Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H., 1995:** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59(1)**: 143 - 169

**Andrianasolo E.H., Gross H., Goeger D., Musafija-Girt M., McPhail K., Leal R.M. Mooberry S.L., Gerwick W.H., 2005:** Isolation of swinholid A and related glycosylated derivatives from two field collections of marine cyanobacteria. *Org. Lett.* **7(7)**: 1375 - 1378

**Assmann M., Lichte E., Pawlik J.R., Köck M., 2000:** Chemical defense of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**: 255 - 262

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., (Eds.), 2003:** Preparation of genomic DNA from bacteria. Chapter 4.2. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1. John Wiley and Sons, New York.

**Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I., 2005:** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**: 1915 - 1920

**Bell A.H., Bergquist P.R., Battershill C.N., 1999:** Feeding biology of *Polymastia croceus*. *Mem. Queensl. Mus.* **44**: 51 - 56

**Bergbauer M., Humberg B., 1999:** Was lebt im Mittelmeer? Kosmos-Verlag, Stuttgart. ISBN 3-440-07733-0

**Bewley C.A., Holland N.D., Faulkner D.J., 1996:** Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* **52(7)**: 716 - 722

**Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T., Prinsep M.R., 2006:** Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* DOI: 10.1039/b502792f

**Borchiellini C., Manuel M., Alivon E., Boury-Esnault N., Vacelet J., Le Parco Y., 2001:** Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *J. Evol. Biol.* **14**: 171 - 179

**Boursaux-Eude C., Gross R., 2000:** New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Res. Microbiol.* **151**: 513 - 519

- Brower D.L., Brower S.M., Hayward D.C., Ball E.E., 1997:** Molecular evolution of integrins: Genes encoding integrin  $\beta$  subunits from a coral and a sponge. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 9182 - 9187
- Brümmer F., Calcinai B., Götz M., Leitermann F., Nickel M., Sidri M., Zucht W., 2003:** Overview on the sponge fauna of the Limski Kanal, Croatia, Northern Adriatic Sea. Boll. Mus. Inst. Biol. Univ. Genova **68**: 219 - 227
- Bryant D.A., 1995:** The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer, Dordrecht. ISBN 0-7923-3222-9
- Carr N.G., 1982:** The biology of cyanobacteria. Blackwell Scientific Publ., Oxford. ISBN 0-632-00695-1
- Carvalho de Souza A., Halkes K.M., Meeldijk J.D., Verkleij A.J., Vliegthart J.F.G., Kamerling J.P., 2005:** Gold glyconanoparticles as probes to explore the carbohydrate-mediated self-recognition of marine sponge cells. Chem. Bio. Chem. **6**: 828 - 831
- Chapela I.H., Rehner S.A., Schultz T.R., Mueller U.G., 1994:** Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. Science **266**: 1691 - 1694
- Coma R., Ribes M., Gili J.-M., Hughes R.N., 2001:** The ultimate opportunists: consumers of seston. Mar. Ecol. Prog. Ser. **219**: 305 - 308
- Corredor J.E., Wilkinson C.R., Vicente V.P., Morell J.M., Otero E., 1988:** Nitrate release by Caribbean reef sponges. Limnol. Oceanogr. **33(1)**: 114 - 120
- Custodio M.R., Prokic I., Steffen R., Koziol C., Borojevic R., Brümmer F., Nickel M., Müller W.E.G., 1998:** Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. Mech. Ageing Dev. **105**: 45 - 59
- Davy S.K., Trautman D.A., Borowitzka M.A., Hinde R., 2002:** Ammonium excretion by a symbiotic sponge supplies the nitrogen requirements of its rhodophyte partner. J. Exp. Biol. **205**: 3505 - 3511
- de Bary A., 1879:** Die Erscheinung der Symbiose. Naturforschung Versammlung Cassel, LI, Tagebl.: 121
- DePriest P.T., 2004:** Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001\*. Annu. Rev. Microbiol. **58**: 273 - 301
- Desjardins M., Griffiths G., 2003:** Phagocytosis: latex leads the way. Curr. Opin. Cell. Biol. **15 (4)**: 498 - 503
- Diaz M.C., Rützler K., 2001:** Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs. Bull. Mar. Sci. **69(2)**: 535 - 546
- Douglas A. E., 1989:** Mycetocyte symbiosis in insects. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. **64(4)**: 409 - 434

- Douglas A.E., 1994:** Symbiotic interactions. Oxford University Press, New York. ISBN 0-19-854294-1
- Ducklow H., 2000:** Bacterial production and biomass in the oceans. pp. 85 – 120. In: Kirchmann D.L., (Ed.): Microbial Ecology of the Oceans. Wiley-Liss. ISBN 0-471-29993-6
- Eilers H., Pernthaler J., Glöckner F.O., Amann R., 2000 I:** Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. Appl. Environ. Microbiol. **66(7)**: 3044 - 3051
- Eilers H., Pernthaler J., Aman R., 2000 II:** Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. Appl Environ. Microbiol. **66(11)**: 4634 - 4640
- Exposito J.-Y., Cluzel C., Garrone R., Lethias C., 2002:** Evolution of collagens. Anat. Rec. **268(3)**: 302 - 316
- Fernàndez-Busquets X., Burger M.M., 1999:** Cell adhesion and histocompatibility in sponges. Microsc. Res. Tech. **44**: 204 - 218
- Fernàndez-Busquets X., Burger M.M., 2003:** Circular proteoglycans from sponges: first members of the spongican family. Cell. Mol. Life Sci. **60**: 88 - 112
- Fernàndez-Busquets X., Kuhns W.J., Simpson T.L., Ho M., Gerosa D., Grob M., Burger M.M., 2002:** Cell adhesion-related proteins as specific markers of sponge cell types involved in allogeneic recognition. Dev. Comp. Immunol. **26**: 313 - 323
- Fieseler L., 2005:** Entdeckung des neuen Candidatus Phylums *Poribacteria*, Dissertation, Universität Würzburg, [http://www.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/frontdoor.php?source\\_opus=1328](http://www.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/frontdoor.php?source_opus=1328)
- Fieseler L., Horn M., Wagner M., Hentschel U., 2004:** Discovery of the novel candidate phylum „*Poribacteria*“ in marine sponges. Appl. Environ. Microbiol. **70(6)**: 3724 - 3732
- Fieseler L., Quaiser A., Schleper C., Hentschel U., 2006:** Analysis of the first genome fragment from the marine sponge-associated, novel candidate phylum *Poribacteria* by environmental genomics. Environ. Microbiol. **8(4)**: 612 - 624
- Flowers A.E., Garson M.J., Webb R.I., Dumdei E.J., Charan R.D., 1998:** Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea heracea* (Keller). Cell. Tissue Res. **292**: 597 - 607
- Freitag T.E., Prosser J.I., 2004:** Differences between betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. Appl. Environ. Microbiol. **70(6)**: 3789 - 3793
- Friedrich A.B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P., Hentschel U., 1999:** Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Mar. Biol. **134**: 461 - 470

- Friedrich A.B., Fischer I., Proksch P., Hacker J., Hentschel U., 2001:** Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. FEMS Microbiol. Ecol. **38**: 105 - 113
- Frost T.M., 1980:** Clearance rate determinations for the freshwater sponge *Spongilla lacustris*: effects of temperature, particle type and concentration, and sponge size. Arch. Hydrobiol. **90**: 330 - 356
- Fuerst J.A., 1995:** The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. Microbiology **141**: 1493 - 1506
- Fuerst J.A., 2005:** Intracellular compartmentation in planctomycetes. Annu. Rev. Microbiol. **59**: 299 - 328
- Fuerst J.A., Webb R.I., Garson M.J., Hardy L., Reiswig H.M., 1998:** Membrane-bounded nucleoids in microbial symbionts of marine sponges. FEMS Microb. Letters **166**: 29 - 34
- Fuhrmann J.A., Sleeter T.D., Carlson C.A., Proctor L.M., 1989:** Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. Mar. Ecol. Prog. Ser. **57**: 207 - 217
- Fuller M.E., Streger S.H., Rothmel R.K., Mailloux B.J., Hall J.A., Onstott T.C., Fredrickson J.K., Balkwill D.L., DeFlaun M.F., 2000:** Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. Appl. Environ. Microbiol. **66(10)**: 4486 - 4496
- Gallissian M.-F., Vacelet J., 1976:** Ultrastructure de Quelques Stades de l'Ovogenèse de Spongiaires du Genre Verongia (*Dictyoceratida*). Ann. Sci. Naturelles, Zool. **12(18)**: 381 - 404
- Garcia-Manyes S., Bucior I., Ros R., Anselmetti D., Sanz F., Burger M.M., Fernández-Busquets X., 2006:** Proteoglycan mechanics studied by single-molecule force spectroscopy of allotypic cell adhesion glycans. J. Biol. Chem. **281(9)**: 5992 - 5999
- Gatti S., Brey T., 2002:** Methusalem im Meer. Bild der Wissenschaft. **2002(11)**: 10
- Gernert C., Glöckner F.O., Krohne G., Hentschel U., 2005:** Microbial diversity of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. Microb. Ecol. **50(2)**: 206 - 212
- Giovannoni S.J., Stingl U., 2005:** Molecular diversity and ecology of microbial plankton. Nature **437**: 343 - 348
- Goebel W., Gross R., 2001:** Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. Trends Microbiol. **9(6)**: 267 - 273
- Hacker J., Heesemann J., 2004:** Molekulare Infektionsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN 3-8274-1507-1
- Hacker J., Kaper J.B., 2002:** Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes, Vol. 1. Springer, Berlin, ISBN 3-540-42681-7

- Hagström Å., Pommier T., Rohwer F., Simu K., Stolte W., Svensson D., Zweifel U.L., 2002:** Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(7)**: 3628 - 3633
- Hallam S.J., Mincer T.J., Schleper C., Preston C.M., Roberts K. Richardson P.M., DeLong E.F., 2006:** Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *Crenarchaeota*. *PLoS Biol.* **4(4)**: (e95 Epub ahead of print)
- Hanahan D., 1983:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166(4)**: 557 - 580
- Hentschel U., Steinert M., Hacker J., 2000:** Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **8(5)**: 226 - 231
- Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C., Hacker J., 2001:** Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 305 - 312
- Hentschel U., Hopke J., Horn M., Friedrich A.B., Wagner M., Hacker J., Moore B.S., 2002:** Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(9)**: 4431 - 4440
- Hentschel U., Fieseler L., Wehrl M., Gernert C., Steinert M., Hacker J., Horn M., 2003:** Microbial diversity of marine sponges. pp. 59 - 88. In: Müller W.E.G., (Ed.): *Sponges (Porifera)*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* Springer, Heidelberg.
- Hentschel U., Usher K.M., Taylor M.W., 2006:** Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 167 - 177
- Hill R.T., 2004:** Microbes from marine sponges: A treasure trove of biodiversity for natural products discovery. pp. 177 - 190. In: Bull A.T. (Ed.): *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington D.C.
- Hill M., Hill A., Lopez N., Harriott O., 2006:** Sponge-specific bacterial symbionts in the Caribbean sponge, *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida). *Mar. Biol.* **148**: 1221 - 1230
- Hoffmann F., Larsen O., Thiel V., Rapp H.T., Pape T., Michaelis W., Reitner J., 2005:** An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiol. J.* **22**: 1 - 10
- Hölldobler B., Wilson E.O., 1990:** *The ants*. Springer, Berlin.
- Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M., 2002:** *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. Vol. 1, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. ISBN 0-306-47260-0
- Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R., 1998:** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bact.* **180(18)**: 4765 - 4774
- Hughes D.J., Hughes R.N., 1986:** Metabolic implications of modularity: studies on the respiration and growth of *Electra pilosa*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B313**: 23 - 29

- Human P., DeLoach N., (Ed.), 1996:** Reef creature. Identification. Florida, Caribbean, Bahamas. New World Publications, Jacksonville. ISBN 1-878348-01-9
- Humbert-David N., Garrone R., 1993:** A six-armed, tenascin-like Protein extracted from the Porifera *Oscarella tuberculata* (*Homosclerophorida*). Eur. J. Biochem. **216(1)**: 255 - 260
- Imhoff J.R., Stöhr R., 2003:** Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. pp. 35 - 57. In: Müller W.E.G., (Ed.): Sponges (*Porifera*). Prog. Mol. Subcell. Biol. Springer, Heidelberg.
- Janse I., Bok J., Zwart G., 2004:** A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. J. Microbiol. Meth. **57**: 279 - 281
- Kaestner A., 1993:** Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band I: Wirbellose Tiere. Gruner H.E., (Ed.), Gustav Fischer, Stuttgart
- Kaye H.R., 1991:** Sexual reproduction in four Caribbean commercial sponges. II. Oogenesis and transfer of bacterial symbionts. Invert. Reprod. Develop. **19(1)**: 13 - 24
- Keller M., Zengler K., 2004:** Tapping into microbial diversity. Nat. Rev. Microbiol. **2(2)**: 141 - 150
- Kepner R.L JR., Pratt J.R., 1994:** Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. Microbiol. Rev. **58(4)**: 603 - 615
- Kilian E., 1952:** Wasserströmung und Nahrungsaufnahme beim Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis*. Z. vergl. Physiol. **34**: 430 - 447
- Kilian E., 1964:** Zur Biologie der einheimischen Spongilliden. Ergebnisse und Probleme. Zool. Beitr., N.F. **10**: 1
- Kleiber M., 1932:** Body size and metabolism. Hilgardia **6**: 315 - 353
- König G.M., Kehraus S., Seibert S.F., Abdel-Lateff A., Müller D., 2006:** Natural products from marine organisms and their associated microbes. ChemBioChem. **7**: 229 - 238
- Krause D.O., Russel J.B., 1996:** How many ruminal bacteria are there? J. Dairy Sci. **79**: 1467 - 1475
- Kunzmann K., 1996:** Die mit ausgewählten Schwämmen (*Hexactinellida* und *Demospongiae*) aus dem Weddelmeer, Antarktis, vergesellschaftete Fauna. Ber. Polarforsch. **210**: 1 - 93
- Lafi F.F., Garson M.J., Fuerst J.A., 2005:** Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clava* and *Rhabdastrella globostellata*) from the Great Barrier Reef display similar phylogenetic diversity. Microb Ecol. **50(2)**: 213 - 220
- Lesser M.P., 2006:** Benthic-pelagic coupling on coral reefs: feeding and growth of Caribbean sponges. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **328**: 277 - 288

- Lethias C., Garrone R., Mazzorana M., 1983:** Fine structure of sponge cell membranes: comparative study with freeze-fracture and conventional thin section methods. *Tissue Cell*. **15(4)**: 523 - 535
- Levi C., Levi P., 1976:** Embryogenese de *Chondrosia reniformis* (Nardo), demosponge ovipare, et transmission des bacteries symbiotiques. *Ann. Sci. Nat. Zool.* **18**: 367 - 380
- Li C.W., Chen J.Y., Hua T.E., 1998:** Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**: 879 - 882
- Li Z.-Y., He L.-M., Wu J., Jiang Q., 2006:** Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **329**: 75 - 85
- Lopez J.V., McCarthy P.J., Janda K.E., Willoughby R., Pomponi S.A., 1999:** Molecular techniques reveal wide phyletic diversity of heterotrophic microbes associated with *Discodermia* ssp. (Porifera: Demospongiae). *Mem. Queensl. Mus.* **44**: 329 - 341
- Lyman J., Fleming R.H., 1940:** Composition of seawater. *J. Mar. Res. (Sears Foundation)* **3**: 134 - 146
- Macfarlane S., Macfarlane G.T., 2004:** Bacterial diversity in the human gut. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**: 261 - 189
- Magnino G., Sarà A., Lancioni T., Gaino E., 1999:** Endosymbionts of the coral reef sponge *Theonella swinhoei* (Porifera, Demospongiae). *Invert. Biol.* **118(3)**: 213 - 220
- Margulis L., 1970:** Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven.
- Margulis L., 1981:** Symbiosis in cell evolution. Freeman, San Francisco.
- Matthes D., 1978:** Tiersymbiosen. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, ISBN 3-437-20193-X
- Miarons P.B., Fresno M., 2000:** Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *J. Biol. Chem.* **275(38)**: 29283 - 29289
- Milanese M., Chelossi E., Manconi R., Sarà A., Sidri M., Pronzato R., 2003:** The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. *Biomolecular Engineering* **20**: 363 - 368
- Millikan D.S., Ruby E.G., 2002:** Alterations in *Vibrio fischeri* motility correlate with a delay in symbiosis initiation and are associated with additional symbiotic colonization defects. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(5)**: 2519 - 2528
- Moeseneder M.M., Arrieta J.M., Muyzer G., Winter C. Herndl G.J., 1999:** Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(8)**: 3518 - 3525
- Moran N.A., Telang A., 1998:** Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience* **48**: 295 - 304

- Müller W.E.G., Müller I.M., 2003:** Analysis of the sponge (*Porifera*) gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. pp. 1 - 33. In: Müller W.E.G., (Ed.): Sponges (*Porifera*). Prog. Mol. Subcell. Biol. Springer, Heidelberg.
- Müller W.E., Zahn R.K., Gasic M.J., Dogovic N., Maidhof A., Becker C., Diehl-Seifert B., Eich E., 1985:** Avarol, a cytostatically active compound from the marine sponge *Dysidea avara*. Comp. Biochem. Physiol. C. **80(1)**: 47 - 52
- Murphy L.S., Haugen E.M., 1985:** The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. Limnol. Oceanogr. **30(1)**: 47 - 58
- Muyzer G., 1999:** Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. In: Bell C.R., Brylinsky M., Johnson-Green P. (Eds.): Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G., 1993:** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59(3)**: 695 - 700
- Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., Wawer C., 1998:** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. Mol. Microb. Ecol. Man. **3.4.4**: 1 - 27
- Nakaya F., Saito Y., Motokawa T., 2003:** Switching of metabolic-rate scaling between allometry and isometry in colonial ascidians. Proc. R. Soc. Lond. **B270**: 1105 - 1113
- Ohkuma M., Kudo T., 1996:** Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. **62(2)**: 461 - 468
- Olson J.B., Harmody D.K., McCarthy P.J., 2002:**  $\alpha$ -*Proteobacteria* cultivated from marine sponges display branching rod morphology. FEMS Microbiol. Lett. **211(2)**: 169 - 173
- Osinga R., Armstrong E., Burgess J.G. Hoffmann F., Reitner J., Schumann-Kindel G., 2001:** Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. Hydrobiologia **461**: 55 - 62
- Pancer Z., Kruse M., Müller I., Müller W.E.G., 1997:** On the origin of metazoan adhesion receptors: cloning of integrin a subunit from the sponge *Geodia cydonium*. Mol. Biol. Evol. **14(4)**: 391 - 398
- Pawlik J.R., Chanas B., Toonen R.J., Fenical W., 1995:** Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. Mar. Ecol. Prog. Ser. **127**: 183 - 194
- Peterka M., Tepsic K., Accetto T., Kostanjsek R., Ramsak A., Lipoglavsek L., Avgustin G., 2003:** Molecular microbiology of gut bacteria: genetic diversity and community structure analysis. Acta Microbiol. Immunol. Hung. **50(4)**: 395 - 406
- Peters R.H., 1983:** The ecological implications of body size. Cambridge University Press, Cambridge.



- Pile A.J., 1997:** Finding Reiswig's missing carbon: quantification of sponge feeding using dual-beam flow cytometry. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Sym. **2**: 1403 - 1410
- Pile A.J., 1999:** Resource partitioning by Caribbean coral reef sponges: is there enough food for everyone? Mem. Queensl. Mus. **44**: 457 - 461
- Pile A.J., Patterson M.R., Witman J.D., 1996:** *In situ* grazing on plankton <10 µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **141**: 95 - 102
- Pile A.J., Grant A., Hinde R., Borowitzka M.A., 2003:** Heterotrophy on ultraplankton communities is an important source of nitrogen for a sponge-rhodophyte symbiosis. J. Exp. Biol. **206**: 4533 - 4538
- Pimentel-Elardo S., Wehrl M., Friedrich A.B., Jensen P.R., Hentschel U., 2003:** Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. Aquat. Microb. Ecology **33**: 239 - 245
- Poulsen M., Cafaro M., Boomsma J.J., Currie C.R., 2005:** Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. Mol. Ecol. **14**: 3597 - 3604
- Preston C.M., Wu K.Y., Molinski T.F., DeLong E.F., 1996:** A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(13): 6241 - 6246
- Proksch P., Edrada R.A., Ebel R., 2002:** Drugs from the seas - current status and microbiological implications. Appl. Microbiol. Biotechnol. **59**: 125 - 134
- Qiu X., Wu L., Huang H., McDonel P.E., Palumbo A.V., Tiedje J.M., Zhou J., 2001:** Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. Appl. Environ. Microbiol. **67**(2): 880 - 887
- Rappé M.S., Giovannoni S.J., 2003:** The uncultured microbial majority. Annu. Rev. Microbiol. **57**: 369 - 394
- Reiswig H.M., 1971 I:** *In situ* pumping activities of tropical *Demospongiae*. Mar. Biol. **9**: 38 - 50
- Reiswig H.M., 1971 II:** Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. Biol. Bull. **141**: 568 - 591
- Reiswig H.M., 1974:** Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **14**: 231 - 249
- Reiswig H.M., 1975 I:** The aquiferous systems of three marine *Demospongiae*. J. Morph. **145**: 493 - 502
- Reiswig H.M., 1975 II:** Bacteria as food for temperate-water marine sponges. Can. J. Zool. **53**: 582 - 589

- Ribes M., Coma R., Gili J.-M., 1999:** Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (*Demospongiae*, *Dendroceratida*) throughout an annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **176**: 179 - 190
- Riisgård H.U., Larsen P.S., 2001:** Minireview: Ciliary filter feeding and bio-fluid mechanics-present understanding and unsolved problems. *Limnol. Oceanogr.* **46(4)**:882 - 891
- Riisgård H.U., Thomassen S., Jakobsen H., Weeks J.M., Larsen P.S., 1993:** Suspension feeding in marine sponges *Halichondria panicea* and *Haliclona urceolus*: effects of temperature on filtration rate and energy cost of pumping. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **96**: 177 - 188
- Rottmann M., Schröder H.C., Gramzow M., Renneisen K., Kurelec B., Dorn A., Friese U., Müller W.E.G., 1987:** Specific phosphorylation of proteins in pore complex-laminae from the sponge *Geodia cydonium* by the homologous aggregation factor and phorbol ester. Role of protein kinase C in the phosphorylation of DNA topoisomerase II. *EMBO J.* **6**: 3939 - 3944
- Ruby E.G., 1996:** Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 591 - 624
- Ruby E.G., Lee K.-H., 1998:** The *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ association: current ecological paradigms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(3)**: 805 - 812
- Russel J.B., Rychlik J.L., 2001:** Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* **292**: 1119 - 1122
- Sabehi G., Béjà O., Suzuki M.T., Preston C.M., DeLong E.F., 2004:** Different SAR86 subgroups harbour divergent proteorhodopsins. *Environ. Microbiol.* **6(9)**: 903 - 910
- Santavy D.L., Willenz P., Colwell R.R., 1990:** Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(6)**: 1750 - 1762
- Sarà M., 1971:** Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (*Cyanophyceae*) and *Ircinia variabilis* (*Demospongiae*). *Mar. Biol.* **11**: 214 - 221
- Sarà M., Vacelet J., 1973:** Écologie des Démosponges. pp. 462 - 576. In : Grassé P.P., (Ed.): *Traité de Zoologie. III Spongiaires.* Masson,
- Schmidt I., 1970:** Phagocytose et pinocytose chez les Spongillidae. *Z. vergleich. Physiol.* **66**: 398 - 420
- Schröder D., Deppisch H., Obermayer M., Krohne G., Stackebrandt E., Hölldobler B., Goebel W., Gross R., 1996:** Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural analysis. *Mol. Microbiol.* **21**: 479 - 489.
- Schröder H.C., Ushijima H., Krasko A., Gamulin V., Thakur N.L., Diehl-Seifert B., Müller I.M., Werner W.E.G., 2003:** Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal *Metazoa*. *J. Biol. Chem.* **278(35)**: 32810 - 32817

- Schütze J., Skorokhod A., Müller I.M., Müller W.E.G., 2001:** Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix: cloning and expression of structural proteins from the demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* **53**: 402 - 415
- Sciscioli M., Liaci L.S., Lepore E., Gherardi M., Simpson T.L., 1991:** Ultrastructural study of the mature egg of the marine sponge *Stelletta grubii* (Porifera, Demospongiae). *Mol. Reprod. Dev.* **28(4)**: 346 - 350
- Smith D.C., Douglas A.E., 1987:** The biology of symbiosis. Edward Arnold Publishers, London, ISBN 0-7131-2939-5
- Steindler L., Huchon D., Avni A., Ilan M., 2005:** 16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(7)**: 4127 - 4131
- Steinert M., Hentschel U., Hacker J., 2000:** Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction. *Naturwissenschaften* **87**: 1 - 11
- Stephens G.C., Schinske R.A., 1961:** Uptake of amino acids by marine invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* **6**: 175 - 181
- Stuart V., Klumpp D.W., 1984:** Evidence for food-resource partitioning by kelp-bed filter feeders. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **16**: 27 - 37
- Sullivan J.T., Trzebiatowski J.R., Cruickshank R.W., Gouzy J., Brown S.D., Elliot R.M., Fleetwood D.J., McCallum N.G., Rossbach U., Stuart G.S., Weaver J.E., Webby R.J., de Bruijn F.J., Ronson C.W., 2002:** Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. *J. Bacteriol.* **184(11)**: 3086 - 3095
- Taylor M.W., Schupp P.J., Dahllöf I., Kjelleberg S., Steinberg P.D., 2004:** Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ. Microbiol.* **6(2)**: 121 - 130
- Taylor M.W., Schupp P.J., de Nys R., Kjelleberg S., Steinberg P.D., 2005:** Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ. Microbiol.* **7(3)**: 419 - 433
- Teeyapant R., Woerdenbag H.J., Kreis P., Hacker J., Wray V., Witte L., Proksch P., 1993:** Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Z. Naturforsch. C* **48**: 939 - 945
- Tepsuporn S., Kaltenbach J.C., Kuhns W.J., Burger M.M., Fernandez-Busquets X., 2003:** Apoptosis in *Microciona prolifera* allografts. *Biol. Bull.* **205**: 199 - 201
- Thakur N.L., Müller W.E.G., 2005:** Sponge-bacteria association: A useful model to explore symbiosis in marine invertebrates. *Symbiosis* **39**: 109 - 116
- Thiel V., Imhoff J.F., 2003:** Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. *Biomolecular Engineering* **20**: 421 - 423
- Thompson F.L., Iida T., Swings J., 2004:** Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68(3)**: 403 - 431

- Thoms C., Horn M., Wagner M., Hentschel U., Proksch P., 2003:** Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar. Biol.* **42**: 685 - 692
- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.-P., Schleper C., 2005:** Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic *Crenarchaeota* in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* **7(12)**: 1985 - 1995
- Turon X., Galera J., Uriz M.J., 1997:** Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J. Exp. Zool.* **278**: 22 - 36
- Uriz M.-J., Turon X., Becerro M.A., Agell G., 2003:** Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns and biological functions. *Microscop. Res. Techn.* **62**: 279 - 299
- Usher K.M., Kuo J., Fromont J., Sutton D.C., 2001:** Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* **461**: 15 - 23
- Usher K.M., Sutton D.C., Toze S., Kuo J., Fromont J., 2005:** Inter-generational transmission of microbial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Mar. Freshwater Res.* **56**: 125 - 131
- Vacelet J., 1970:** Description de cellules a bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. *J. Microscopie* **9(3)**: 333 - 346
- Vacelet J., 1971:** Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée Chroococcale et une éponge du genre *Verongia*. *J. Microscopie T.* **12**: 363 - 380
- Vacelet J., 1975:** Étude en Microscopie Électronique de l'Association Entre Bactéries et Spongiaires du Genre *Verongia* (*Dictyoceratida*). *J. Microscopie Biol. Cell.* **23**: 271 - 288
- Vacelet J., Boury-Esnault N., 1995:** Carnivorous sponges. *Nature* **373**: 333 - 335
- Vacelet J., Donadey C., 1977:** Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**: 301 - 314
- Varga G.A., Kolver E.S., 1997:** Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *J. Nutr.* **127**: 819S - 823S
- Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.-H., Smith H.O., 2004:** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66 - 74
- Viprey V., Del Greco A., Golinowski W., Broughton W.J., Perret X., 1998:** Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* **28(6)**: 1381 - 1389

- Vogel S., 1977:** Current-induced flow through living sponges in nature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74(5)**: 2069 - 2071
- Vollmer S.V. & Edmunds P.J., 2000:** Allometric scaling in small colonies of the scleractinian coral *Siderastrea siderea* (Ellis and Solander). Biol. Bull. **199**: 21 - 28
- Webster N.S., Hill R.T., 2001:** The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an  $\alpha$ -Proteobacterium. Mar. Biol. **138**: 843 - 851
- Webster N.S., Watts J.E.M., Hill R.T., 2001 I:** Detection and phylogenetic analysis of novel crenarchaeote and euryarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier Reef sponge. Mar. Biotechnol. **3(6)**: 600 - 608
- Webster N.S., Wilson K.J., Blackall L.L., Hill R.T., 2001 II:** Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. Appl. Environ. Microbiol. **67(1)**: 434 - 444
- Webster N.S., Webb R.I., Ridd M.J., Hill R.T., Negri A.P., 2001 III:** The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. Environ. Microbiol. **3(1)**: 19 - 31
- Webster N.S., Negri A.P., Munro M.M.H.G., Battershill C.N., 2004:** Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. Environ. Microbiol. **6(3)**: 288 - 300
- Wehrl M., 2001:** Untersuchungen zur Interaktion des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* mit assoziierten Mikroorganismen. Diplomarbeit. Universität Würzburg.
- Wehrl M., Steinert M., Hentschel U., 2006:** Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Microb. Ecol.: im Druck
- Weisz J.B., 2006:** Measuring impacts of associated microbial communities on Caribbean reef sponges: Searching for symbiosis. PhD-Thesis, University Chapel Hill, North Carolina, USA
- West G.B., Brown J.H., 2005:** The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. J. Exp. Biol. **208**: 1575 - 1592
- West G.B., Brown J.H., Enquist B.J., 1997:** A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. Science **276**: 122 - 126
- West G.B., Woodruff W.H., Brown J.H., 2002:** Allometric scaling of metabolic rate from molecules and mitochondria to cells and mammals. PNAS **99**: 2473 - 2478
- Wichels A., Würtz S., Döpke H., Schütt C., Gerdtz G., 2006:** Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). FEMS Microbiol. Ecol. **56**: 102 - 118
- Wiens M., Korzhev M., Krasko A., Thakur N.L., Perović-Ottstadt S., Breter H.J., Ushijima H., Diehl-Seifert B., Müller I.M., Müller W.E.G., 2005:** Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway. J. Biol. Chem. **280(30)**: 27949 - 27959

- Wilkinson C.R., 1978 I:** Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**: 161 - 167
- Wilkinson C.R., 1978 II:** Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar. Biol.* **49**: 169 - 176
- Wilkinson C.R., 1978 III:** Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**: 177 - 185
- Wilkinson C.R., 1980:** Cyanobacteria symbiotic in marine sponges. pp. 553 - 563. In: Schwemmler W., Schenk H.E.A. (Eds.): *Endocytobiology, endosymbiosis, and cell biology*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Wilkinson C.R., 1983 I:** Net primary productivity in coral reef sponges. *Science* **219**: 410 - 412
- Wilkinson C.R., 1983 II:** Phylogeny of bacterial and cyanobacterial symbionts in marine sponges. pp. 993 - 1004. In: *Endocytobiology Vol. II*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Wilkinson C.R., 1984:** Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. *Proc. R. Soc. Lond.* **B 220**: 509 - 517
- Wilkinson C.R., 1987 I:** Significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology. *Symbiosis* **4**: 135 - 146
- Wilkinson C.R., 1987 II:** Interocean differences in size and nutrition of coral reef sponge populations. *Science* **236**: 1654 - 1657
- Wilkinson C.R., Fay P., 1979:** Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* **279**: 527 - 529
- Wilkinson C.R., Garrone R., 1980:** Nutrition of marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. pp. 157 - 161. In: Smith D.C., Tiffon Y. (Ed.): *Nutrition in the lower Metazoa*. Pergamon Press, Oxford.
- Wilkinson C.R., Vacelet J., 1979:** Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **37**: 91 - 104
- Wilkinson C.R., Garrone R., Hergage D., 1979:** *In vitro* digestion of insoluble sponge collagen by sponge symbiotic bacteria. pp. 361 - 364. In: Levi C., Boury-Esnault (Eds.): *Biologie des Spongiaires*. Colloq. Int. C.N.R.S. **291**
- Wilkinson C.R., Nowak M., Austin B., Colwell R.R., 1981:** Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microb. Ecol.* **7**: 13 - 21
- Wilkinson C.R., Garrone R., Vacelet J., 1984:** Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. *Proc. R. Soc. Lond.* **B 220**: 519 - 528

**Wilkinson C.R., Cheshire A.C., Klumpp D.W., McKinnon A.D., 1988:** Nutritional spectrum of animals with photosynthetic symbionts – corals and sponges. Proc. 6<sup>th</sup> Internat. Coral Reef Symp., Australia **3**: 27 - 30

**Wilson H.V., 1907:** On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool. **5**: 245 - 258

**Wilson M., McNab R., Henderson B., (Eds.), 2002:** Bacterial disease mechanisms. An introduction to cellular microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0-521-79689-X

**Witte U., Brattegard T., Graf G., Springer B., 1997:** Particle capture and deposition by deep-sea sponges from the Norwegian-Greenland Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. **154**: 241 - 252

**Yahel G., Sharp J.H., Marie D., Häse C., Genin A., 2003:** In situ feeding and element removal in the symbiont-bearing sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC is the major source for carbon. Limnol. Oceanogr. **48(1)**: 141 - 149

**Zientz E., Feldhaar H., Stoll S., Gross R., 2005:** Insights into the microbial world associated with ants. Arch. Microbiol. **184**: 199 - 206





## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

~	ungefähr
<; <<	kleiner als; wesentlich kleiner als
±	plus / minus
°C	Grad Celsius, Temperatur (SI-Einheit)
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
A	Absorption
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumsulfat
AIX	Ampicillin-, IPTG- und X-Gal-enthaltendes Nährmedium
AK	Antikörper
ASW	synthetisches Seewasser
aufgen.	aufgenommen / -e
<i>b</i>	allometrischer Exponent
B : H	Breite : Höhe
bak. / Bak.	bakteriell / Bakterien
bp	Basenpaare
BP	„band-pass“: Bandpass(-filter)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
$C_0$	bakterielle Konzentration bei Filtrationsexperimenten
cc	konzentriert, z.B. HCl <sub>cc</sub>
CFU	„colony forming unit“, äquivalent zu vermehrungsfähiger Einzelzelle
Cm	Chloramphenicol
CMFASW	Calcium- / Magnesium-freies Seewasser
CTAB	Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Da	Dalton, obsolete Atommasseneinheit, 1 Da = 1 u = 1,6605 x 10 <sup>-23</sup> g
DAPI	Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
dil	verdünnt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA
dNTP	Desoxynukleotid
ddNTP	Didesoxynukleotid
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz–Dihydrat
EM	Elektronenmikroskop
Em	Emissionsstrahlung
engl.	englisch
et al.	„et altera“: und weitere
etc.	„et cetera“: und so weiter
EtOH	Ethanol

Exc	Excitation, Physik: Anregung
exp.	experimentell / -e
f.	für
5(6)-FAM/SE	5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
Frc.	Fructose
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung: $9,81 \text{ m s}^{-2}$
ggf.	gegebenenfalls
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>d, 200 nm</sub>	doppelt destilliertes Wasser, gefiltert mit 200 nm Porenweite
„insert“	eingefügter DNA-Abschnitt
<i>in vivo</i>	im lebenden Zustand
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kilo, $10^3 \times$
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm, Masse (SI-Einheit)
Km	Kanamycin
Kon.	Kontrolle
kult.	kultivierbar
λ	Wellenlänge
lacZ	Galactosidase codierendes Gen
LM	Lösungsmittel
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
LP	„long-pass“: Tiefpass(-filter)
Lsg.	Lösung
μ	Mikro, $10^{-6} \times$
m	Milli, $10^{-3} \times$
m	Meter, Länge (SI-Einheit)
M	Mega, $10^6 \times$
M	molar, $1 \text{ mol l}^{-1}$
math.	mathematisch
max	maximal
MeOH	Methanol
m <sub>f</sub>	Nassmasse
min	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Million, $10^6$
mol	Mol, Stoffmenge mit $6,0221 \times 10^{23}$ Teilchen (SI-Einheit)
MO	Mikroorganismus, hier Bakterium
Mrd.	Milliarde, $10^9$
ms	Millisekunde
m <sub>t</sub>	Trockenmasse
n	Nano, $10^{-9} \times$
n	Anzahl
N	Normal, chem., entsprechend $1 \text{ Mol H}^+ / \text{OH}^- \text{ l}^{-1} \text{ LM}$

N <sub>2, fl</sub>	Stickstoff, flüssig
n/a	„not applicable“: nicht verfügbar
norm.	normalisiert
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
o.	oder
OD <sub>(600)</sub>	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
OTU	„operational taxonomic unit“
p	Zufallswahrscheinlichkeit
p.a.	„pro analysi“: für Analysezwecke
Pa	Pascal, Druck (SI-Einheit)
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	„Polymerase-Chain-Reaction“: Polymerasekettenreaktion
pellet	Niederschlag, Sediment
r <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
<i>r</i>	Filtrationsrate
<i>r<sub>n</sub></i>	normalisierte Filtrationsrate
<i>r<sub>nt</sub></i>	normalisierte Filtrationsrate für Trockenmasse
R	Resistenz
Ref.	Referenz
Repr.	Reproduktion / -s
RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RG	Reaktionsgefäß
RT	Raumtemperatur (~20°C)
rsGFP	Derivat des wt-GFP, mit Verschiebung in den spektralen Rotbereich
$\Sigma$	Summe
s	Sekunde, Zeit (SI-Einheit)
s.	siehe
S	Svetberg, Sedimentationskoeffizient
S	Schwammindividuum
s <sub>ELO</sub>	Elongationszeit bei PCR in s
Sequ.	Sequenz
Skt.	Skalenteil
sp.	„species“: Biologie: Art
SP	„short-pass“: Hochpass(-filter)
Str	Streptomycin
Sym.	Symbionten
Tab.	Tabelle
5(6)-TAMRA/SE	5-(und-6)-Carboxytetramethylrhodamin-Succinimidyl-Ester
T <sub>AN</sub>	Annealingtemperatur bei PCR
template	Matrizen-DNA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
u.	und
U	„unit“: funktionelle Mengeneinheit bei Enzymen
ÜN	über Nacht
unkult.	unkultivierbar
UV	ultraviolettes Licht ( $\lambda = 380 - 10$ nm)
V	Volt, elektrische Spannung (SI-Einheit)
Vol.	Volumenteil
vs.	„versus“: gegenüber
wt	Wildtyp

X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
y	Kurvensteigung bei Filtrationsexperimenten
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
zw.	zwischen

**Anhang A1:** Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* aus **Kap. 4.2.** Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177</b>								
1	90	17,2	40 - 140	0,9840	1,9644 x 10 <sup>8</sup>	2,1827x10 <sup>6</sup>	2,6014 x 10 <sup>6</sup>	1,3584 x 10 <sup>7</sup>
2	50	9,6	40 - 140	0,9635	1,8881 x 10 <sup>8</sup>	3,7763x10 <sup>6</sup>	2,7809 x 10 <sup>6</sup>	1,4521 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>α-Proteobakterium</i> SB89</b>								
1	90	17,2	100 - 210	0,9609	1,8418 x 10 <sup>8</sup>	2,0464 x 10 <sup>6</sup>	2,4390 x 10 <sup>6</sup>	1,2736 x 10 <sup>7</sup>
2	60	11,5	100 - 210	0,9857	1,6232 x 10 <sup>8</sup>	2,7053 x 10 <sup>6</sup>	2,2601 x 10 <sup>6</sup>	1,1802 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>Bacillus</i> sp. SB144</b>								
1	50	9,6	60 - 160	0,9613	1,4708 x 10 <sup>8</sup>	2,9415 x 10 <sup>6</sup>	2,1661 x 10 <sup>6</sup>	1,1311 x 10 <sup>7</sup>
2	50	9,6	60 - 160	0,9588	1,4170 x 10 <sup>8</sup>	2,8340 x 10 <sup>6</sup>	2,0870 x 10 <sup>6</sup>	1,0898 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>Pseudoalteromonas</i> sp. SB200</b>								
1	90	17,2	20 - 120	0,8849	1,9594 x 10 <sup>8</sup>	2,1771 x 10 <sup>6</sup>	2,5947 x 10 <sup>6</sup>	1,3550 x 10 <sup>7</sup>
2	60	11,5	40 - 140	0,8858	1,8734 x 10 <sup>8</sup>	3,1224 x 10 <sup>6</sup>	2,6085 x 10 <sup>6</sup>	1,3622 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>Pirellula</i> sp. SB81</b>								
1	90	17,2	60 - 160	0,9597	1,6316 x 10 <sup>8</sup>	1,8128 x 10 <sup>6</sup>	2,1606 x 10 <sup>6</sup>	1,1283 x 10 <sup>7</sup>
2	110	21,1	60 - 160	0,9319	1,8426 x 10 <sup>8</sup>	1,6751 x 10 <sup>6</sup>	2,5308 x 10 <sup>6</sup>	1,3216 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>Pirellula marina</i> DSM3645</b>								
1	135	25,9	40 - 140	0,9341	1,2758 x 10 <sup>8</sup>	9,4501 x 10 <sup>5</sup>	1,9643 x 10 <sup>6</sup>	1,0257 x 10 <sup>7</sup>
2	90	17,2	40 - 140	0,8652	1,1487 x 10 <sup>8</sup>	1,2763 x 10 <sup>6</sup>	1,5212 x 10 <sup>6</sup>	7,9435 x 10 <sup>6</sup>

**Fortsetzung Anhang A1:** Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* aus **Kap. 4.2.** Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	$r^2$ der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate $r$	Normalisierte Filtrationsrate $r_n$	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse $r_{nt}$
<b>Bakterielles Seewasserkonsortium</b>								
1	108	20,7	140 - 240	0,8901	$9,6499 \times 10^7$	$8,9351 \times 10^5$	$1,3177 \times 10^6$	$6,8794 \times 10^6$
2	156	29,9	140 - 240	0,9873	$1,6040 \times 10^8$	$1,0282 \times 10^6$	$2,9090 \times 10^6$	$1,5188 \times 10^7$
3	52	10,0	140 - 240	0,9848	$1,3410 \times 10^8$	$2,5788 \times 10^6$	$1,9488 \times 10^6$	$1,0174 \times 10^7$
4	37	7,1	140 - 240	0,8983	$8,4641 \times 10^7$	$2,2876 \times 10^6$	$1,4088 \times 10^6$	$7,3552 \times 10^6$
<b>Schwammsymbiontenkonsortium</b>								
1	79	15,1	15 - 130	0,2941	$1,3695 \times 10^6$	$1,7336 \times 10^4$	$1,8169 \times 10^4$	$9,4878 \times 10^4$
2	39	7,5	15 - 150	0,5459	$2,5626 \times 10^6$	$6,5708 \times 10^4$	$4,1659 \times 10^4$	$2,1754 \times 10^5$
3	28	5,4	40 - 130	0,6971	$2,6505 \times 10^6$	$9,4660 \times 10^4$	$5,0625 \times 10^4$	$2,6436 \times 10^5$
4	48	9,2	40 - 130	0,1466	$6,9950 \times 10^6$	$1,4573 \times 10^5$	$1,0454 \times 10^5$	$5,4591 \times 10^5$
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177 – CFU vs. DAPI (aufgelistet sind die CFU-Werte)</b>								
1	118	22,6	30 - 120	0,9737	$1,9311 \times 10^8$	$1,6365 \times 10^6$	$2,7279 \times 10^6$	$1,4245 \times 10^7$
2	111	21,3	30 - 120	0,9715	$1,9368 \times 10^8$	$1,7528 \times 10^6$	$2,6805 \times 10^6$	$1,3997 \times 10^7$

**Fortsetzung Anhang A1:** Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* aus **Kap. 4.3**. Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<i>Vibrio</i> sp. SB177								
1	50	9,58	40 - 140	0,9635	1,8881 x 10 <sup>8</sup>	3,7763 x 10 <sup>6</sup>	2,7809 x 10 <sup>6</sup>	1,4521 x 10 <sup>7</sup>
2	90	17,24	40 - 140	0,9840	1,9644 x 10 <sup>8</sup>	2,1827 x 10 <sup>6</sup>	2,6014 x 10 <sup>6</sup>	1,3584 x 10 <sup>7</sup>
3	48	9,19	60 - 160	0,9529	1,8934 x 10 <sup>8</sup>	3,9447 x 10 <sup>6</sup>	2,8298 x 10 <sup>6</sup>	1,4777 x 10 <sup>7</sup>
4	68	13,02	40 - 120	0,9933	1,9764 x 10 <sup>8</sup>	2,9064 x 10 <sup>6</sup>	2,6751 x 10 <sup>6</sup>	1,3969 x 10 <sup>7</sup>
5	75	14,36	120 - 240	0,9928	1,9891 x 10 <sup>8</sup>	2,6521 x 10 <sup>6</sup>	2,6521 x 10 <sup>6</sup>	1,3849 x 10 <sup>7</sup>
6	143	27,39	60 - 150	0,9809	1,9611 x 10 <sup>8</sup>	1,3714 x 10 <sup>6</sup>	3,1872 x 10 <sup>6</sup>	1,6644 x 10 <sup>7</sup>
7	99	18,96	60 - 150	0,9819	1,9390 x 10 <sup>8</sup>	1,9586 x 10 <sup>6</sup>	2,5945 x 10 <sup>6</sup>	1,3548 x 10 <sup>7</sup>

**Anhang A2:** Filtrationsexperimente an *C. reniformis* aus **Kap. 4.2.** Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177</b>								
1	23	—	100 - 210	0,9937	1,0659 x 10 <sup>8</sup>	4,5357 x 10 <sup>6</sup>	—	—
2	24	—	100 - 210	0,9830	1,1243 x 10 <sup>8</sup>	4,6849 x 10 <sup>6</sup>	—	—
<b>Schwammsymbiontenkonsortium</b>								
1	44	—	60 - 180	0,0648	3,0441 x 10 <sup>6</sup>	6,9184 x 10 <sup>4</sup>	—	—
2	54	—	105 - 210	0,2987	9,1127 x 10 <sup>6</sup>	1,7033 x 10 <sup>5</sup>	—	—



**Anhang A3:** Filtrationsexperimente an *D. avara* aus **Kap. 4.2.** Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177</b>								
1	12	0,93	20 - 120	0,97624	1,2343 x 10 <sup>8</sup>	1,0550 x 10 <sup>7</sup>	2,6758 x 10 <sup>6</sup>	3,3857 x 10 <sup>7</sup>
2	10	0,79	60 - 180	0,8722	1,0266 x 10 <sup>8</sup>	1,0266 x 10 <sup>7</sup>	2,3188 x 10 <sup>6</sup>	2,9340 x 10 <sup>7</sup>
<b>Schwammsymbiontenkonsortium</b>								
1	12	0,95	60 - 180	0,8291	9,8170 x 10 <sup>7</sup>	8,1808 x 10 <sup>6</sup>	2,1141 x 10 <sup>6</sup>	2,6749 x 10 <sup>7</sup>
2	15	1,17	60 - 180	0,5346	5,9868 x 10 <sup>7</sup>	4,0452 x 10 <sup>6</sup>	1,2204 x 10 <sup>6</sup>	1,5442 x 10 <sup>7</sup>
3	16	1,26	0 - 90	0,9422	1,1565 x 10 <sup>8</sup>	7,2279 x 10 <sup>6</sup>	2,3099 x 10 <sup>6</sup>	2,9227 x 10 <sup>7</sup>
4	22	1,70	60 - 180	0,85513	9,4219 x 10 <sup>7</sup>	4,3823 x 10 <sup>6</sup>	1,7419 x 10 <sup>6</sup>	2,2041 x 10 <sup>7</sup>

**Fortsetzung Anhang A3:** Filtrationsexperimente an *D. avara* aus **Kap. 4.3.** Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177</b>								
11	180	14,2	0 - 90	0,9750	1,9889 x 10 <sup>8</sup>	1,10505 x 10 <sup>6</sup>	2,1091 x 10 <sup>6</sup>	2,6686 x 10 <sup>7</sup>
22	100	7,90	0 - 90	0,7469	1,9802 x 10 <sup>8</sup>	1,9801 x 10 <sup>6</sup>	2,4488 x 10 <sup>6</sup>	3,0985 x 10 <sup>7</sup>
33	18	1,41	20 - 120	0,7425	8,4157 x 10 <sup>7</sup>	4,7279 x 10 <sup>6</sup>	1,6347 x 10 <sup>6</sup>	2,0684 x 10 <sup>7</sup>
44	12	0,93	20 - 120	0,9762	1,2343 x 10 <sup>8</sup>	1,0550 x 10 <sup>7</sup>	2,6758 x 10 <sup>6</sup>	3,3857 x 10 <sup>7</sup>
55	10	0,79	60 - 180	0,8722	1,0266 x 10 <sup>8</sup>	1,0266 x 10 <sup>7</sup>	2,3188 x 10 <sup>6</sup>	2,9340 x 10 <sup>7</sup>
66	25	1,98	0 - 120	0,9906	1,8181 x 10 <sup>8</sup>	7,2725 x 10 <sup>6</sup>	3,2313 x 10 <sup>6</sup>	4,0885 x 10 <sup>7</sup>
77	38	3,00	0 - 120	0,9934	1,8648 x 10 <sup>8</sup>	4,9075 x 10 <sup>6</sup>	2,9705 x 10 <sup>6</sup>	3,7585 x 10 <sup>7</sup>

**Anhang A4:** Filtrationsexperimente an *T. aurantium* aus **Kap. 4.2**. Experimentelle Daten zu den einzelnen Schwammindividuen.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177</b>								
1	86	—	80 - 180	0,9687	1,5950 x 10 <sup>8</sup>	1,8546 x 10 <sup>6</sup>	—	—
2	117	—	80 - 180	0,8670	1,0656 x 10 <sup>8</sup>	9,1077 x 10 <sup>5</sup>	—	—
<b>α-Proteobakterium SB89</b>								
1	66	—	120 - 210	0,4415	6,4982 x 10 <sup>7</sup>	9,8457 x 10 <sup>5</sup>	—	—
2	47	—	120 - 210	0,3155	5,6891 x 10 <sup>7</sup>	1,2105 x 10 <sup>6</sup>	—	—
<b>Bakterielles Seewasserkonsortium</b>								
1	84	—	30 - 120	0,8999	1,8239 x 10 <sup>8</sup>	2,1713 x 10 <sup>6</sup>	—	—
2	86	—	30 - 120	0,9951	1,2733 x 10 <sup>8</sup>	1,4806 x 10 <sup>6</sup>	—	—
<b>Schwammsymbiontenkonsortium</b>								
1	111	—	60 - 150	0,8310	8,8295 x 10 <sup>7</sup>	7,9545 x 10 <sup>5</sup>	—	—
2	66	—	60 - 150	0,9660	3,9071 x 10 <sup>7</sup>	5,9199 x 10 <sup>5</sup>	—	—

**Anhang A5:** Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* aus **Kap. 4.2.** Einfluss der Flagellierung auf die bakterielle Aufnahme.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio fischeri</i> ES114</b>								
1	33	6,3	60 - 160	0,9546	1,9346 x 10 <sup>8</sup>	5,8623 x 10 <sup>6</sup>	3,3989 x 10 <sup>6</sup>	1,7745 x 10 <sup>7</sup>
2	28	5,4	60 - 170	0,9000	1,8489 x 10 <sup>8</sup>	6,6031 x 10 <sup>6</sup>	3,5314 x 10 <sup>6</sup>	1,8437 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>V. fischeri</i> DM131</b>								
1	33	6,3	60 - 160	0,6180	1,5510 x 10 <sup>8</sup>	4,7001 x 10 <sup>6</sup>	2,7250 x 10 <sup>6</sup>	1,4227 x 10 <sup>7</sup>
2	27	5,2	60 - 170	0,6264	1,4549 x 10 <sup>8</sup>	5,3885 x 10 <sup>6</sup>	2,8331 x 10 <sup>6</sup>	1,4791 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>V. fischeri</i> DM61</b>								
1	60	11,5	60 - 160	0,9821	1,5138 x 10 <sup>8</sup>	2,5229 x 10 <sup>6</sup>	2,1077 x 10 <sup>6</sup>	1,1004 x 10 <sup>7</sup>
2	29	5,6	60 - 170	0,9045	1,6922 x 10 <sup>8</sup>	5,8353 x 10 <sup>6</sup>	3,1733 x 10 <sup>6</sup>	1,6567 x 10 <sup>7</sup>

**Fortsetzung Anhang A5:** Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* aus **Kap. 4.2.** Inhibition der bakteriellen Aufnahme durch Fructose.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177 – 15 mM Frc.</b>								
1	39	7,5	80 - 200	0,7823	1,2428 x 10 <sup>8</sup>	3,1867 x 10 <sup>6</sup>	2,0202 x 10 <sup>6</sup>	1,0547 x 10 <sup>7</sup>
2	79	15,1	80 - 200	0,8322	1,3943 x 10 <sup>8</sup>	1,7649 x 10 <sup>6</sup>	1,8496 x 10 <sup>6</sup>	9,6565 x 10 <sup>6</sup>
1	66	12,6	0 - 120	0,9310	1,4663 x 10 <sup>8</sup>	2,2217 x 10 <sup>6</sup>	1,9964 x 10 <sup>6</sup>	1,0423 x 10 <sup>7</sup>
2	91	17,4	0 - 120	0,9956	1,9795 x 10 <sup>8</sup>	2,1753 x 10 <sup>6</sup>	2,6231 x 10 <sup>6</sup>	1,3695 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177 – 20 mM Frc.</b>								
1	102	19,5	60 - 150	0,4640	6,3056 x 10 <sup>7</sup>	6,1820 x 10 <sup>5</sup>	8,4848 x 10 <sup>5</sup>	4,4298 x 10 <sup>6</sup>
2	77	14,8	60 - 150	0,9908	1,8026 x 10 <sup>8</sup>	2,3410 x 10 <sup>6</sup>	2,3965 x 10 <sup>6</sup>	1,2512 x 10 <sup>7</sup>

**Fortsetzung Anhang A5:** Filtrationsexperimente an *A. aerophoba* aus **Kap. 4.2.** Enzymbehandelte „Futterbakterien“ und Symbionten.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	$r^2$ der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate $r$	Normalisierte Filtrationsrate $r_n$	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse $r_{nt}$
<b><i>Vibrio</i> sp. SB177 – Papain</b>								
1	52	10,0	30 - 120	0,9447	$1,9337 \times 10^8$	$3,7187 \times 10^6$	$2,8101 \times 10^6$	$1,4671 \times 10^7$
2	82	15,7	30 - 120	0,5638	$1,8932 \times 10^8$	$2,3088 \times 10^6$	$2,5062 \times 10^6$	$1,3085 \times 10^7$
<b>Symbionten – Papain (DGGE)</b>								
1	71	13,6	0 - 300	0,7951	$9,8369 \times 10^7$	$1,3855 \times 10^6$	$1,3215 \times 10^6$	$6,8996 \times 10^6$
2	81	15,5	0 - 300	0,9498	$1,1813 \times 10^8$	$1,4584 \times 10^6$	$1,5647 \times 10^6$	$8,1689 \times 10^6$

**Angang A6:** Filtrationsexperimente zur DGGE-Analyse aus **Kap. 4.4** an *A. aerophoba* und *Tethya aurantium*.

Individuum	Nassmasse (g)	Trockenmasse (g)	Zeitintervall (min)	r <sup>2</sup> der Regression	Aufgen. MO's Schwamm <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Filtrationsrate <i>r</i>	Normalisierte Filtrationsrate <i>r<sub>n</sub></i>	Normal. Filtrationsrate für Trockenmasse <i>r<sub>nt</sub></i>
<b><i>A. aerophoba</i> - Seewasserkonsortium</b>								
1	61	11,7	0-300	-	1,6528 x 10 <sup>8</sup>	2,7096 x 10 <sup>6</sup>	2,2916 x 10 <sup>6</sup>	1,1964 x 10 <sup>7</sup>
2	72	13,8	0-300	-	1,8242 x 10 <sup>8</sup>	2,5336 x 10 <sup>6</sup>	2,4454 x 10 <sup>6</sup>	1,2767 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>A. aerophoba</i> - Symbiontenkonsortium</b>								
1	116	22,2	0-300	-	9,8229 x 10 <sup>7</sup>	8,4677 x 10 <sup>5</sup>	1,3769 x 10 <sup>6</sup>	-
2	76	14,6	0-300	-	1,4397 x 10 <sup>6</sup>	1,4395 x 10 <sup>6</sup>	1,4565 x 10 <sup>6</sup>	-
<b><i>T. aurantium</i> - Seewasserkonsortium</b>								
1	120	-	0-300	-	6,1420 x 10 <sup>7</sup>	5,1183 x 10 <sup>5</sup>	-	-
2	70	-	0-300	-	9,4840 x 10 <sup>7</sup>	1,3549 x 10 <sup>6</sup>	-	-
<b><i>T. aurantium</i> - Symbiontenkonsortium</b>								
1	120	-	0-300	-	1,0996 x 10 <sup>8</sup>	9,3984 x 10 <sup>5</sup>	-	-
2	70	-	0-300	-	1,1805 x 10 <sup>8</sup>	1,6865 x 10 <sup>6</sup>	-	-

**Anhang B1:** RFLP-Muster zur Unterscheidung von marinen Isolaten und Laborstämmen. Der enzymatische Verdau erfolgte an dem durch PCR amplifizierten Fragment, das mit den Primern 27f/1385r erhalten wurde. Angegeben sind die erhaltenen Fragmentlängen in bp.

Restriktions- enzym	Bakterienisolat			
	<i>E.coli</i> MM 294	<i>V. fischerii</i> ES 114	<i>Vibrio</i> sp. SB177	$\alpha$ -Proteobakterium SB89
Bam H I	1350	1350	1350	1250
Eco R V	1350	1350	1350	1250
Eco R I	720 / 630	1000 / 350	1350	1250
Sal I	540 / 810	1350	1350	1250
Xho I	1350	1350	1350	1250
Hind III	750 / 600	1350	1350	1250
Pst I	850 / 600	490 / 860	1350	830 / 420
Sac I	400 / 950	400 / 950	P: 950 - 400 / 640 - 710	1250

## 8 Publikationen

### Schriftliche Publikationen

- 1) Pimentel-Elardo S., **Wehrl M.**, Friedrich A.B., Jensen P.R., Hentschel U., 2003: Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquat. Microb. Ecol.* **33**: 239 - 245
- 2) Hentschel U., Fieseler L., **Wehrl M.**, Gernert C., Steinert M., Hacker J., Horn M., 2003: Microbial diversity of marine sponges. pp. 59 - 88. In: Müller W.E.G, (Ed.): *Sponges (Porifera)*. Prog. Mol. Subcell. Biol. Springer, Heidelberg.
- 3) Hentschel U., Fieseler L., **Wehrl M.**, Steinert M., Hacker J., 2004: Sponges as ancient niches for marine bacteria. *Nova Acta Leopoldina NF 88*, Nr. **333**: 101 - 106
- 4) **Wehrl M.**, Steinert M., Hentschel U., 2006: Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb. Ecol.*: im Druck
- 5) **Wehrl M.**, Steinert M., Hentschel U.: Specificity of uptake and internal processing of bacteria by marine demosponges: in Vorbereitung

### Posterbeiträge und Vorträge

- 1) Fieseler L., **Wehrl M.**, Steinert M., Hacker J., Hentschel U., 2002: Interactions between the marine sponge *Aplysina aerophoba* and associated microorganisms. 1<sup>st</sup> Symposium of Sonderforschungsbereich 567, **Posterbeitrag C3**
- 2) **Wehrl M.**, Rennemeier C., Steinert M., Hentschel U., 2003: Mechanisms of interaction between the marine sponge *Aplysina aerophoba* and associated microorganisms. VAAM-Jahrestagung, Berlin, **Posterbeitrag PM004**
- 3) **Wehrl M.**, 2004: Strategies of bacterial cell capture by marine sponges. Mini-Symposium "Biochemistry of the pathogen-microbe interaction", Kloster Banz, **Vortragspräsentation**
- 4) **Wehrl M.**, Steinert M., Hentschel U., 2005: Uptake, specificity and processing of bacteria in marine sponges. Joint Meeting of IUMS, San Francisco, **Posterbeitrag B-780**

## **9    Forschungsaufenthalte**

### **Schiffsexpeditionen**

Zweiwöchige Aufenthalte mit dem Forschungsschiff R/V Seward Johnson (Harbor Branch Oceanographic Institution, Fort Pierce, FL, USA) im Hoheitsgebiet der Bahamas im März 2001 und Juni 2002.

### **NOAA-NURC, Key Largo, FL, USA**

Zweiwöchiger Aufenthalt im „National Oceanic and Atmospheric Administration“ – „National Undersea Research Center“ - Labor im Juni 2002.

### **Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, Frankreich**

Zweiwöchige Forschungsaufenthalte im September 2001, April 2002 und April 2003.

### **Ruder Bošković Institute, Rovinj, Kroatien**

Zweiwöchige Forschungsaufenthalte im August 2003, Juni 2004, August 2004 und Mai 2005.



## 10 Curriculum Vitae

**Markus Wehrl**, geboren am 12.09.1974 in Fulda

### Schulausbildung

Aug. 1985 - Juni 1994      Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Fulda.

### Zivildienst

Sep. 1994 - Nov. 1995      Zivildienst im Erna-Hosemann-Haus, Fulda, Trägerschaft durch die Arbeiterwohlfahrt Hessen.

### Diplomstudium

Nov. 1995 - Aug. 2000      Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Pharmazeutische Biologie, Tierphysiologie.

Sep. 2000 - Aug. 2001      Diplomarbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zur Interaktion des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* mit assoziierten Mikroorganismen“ am Institut für Molekulare Infektionsbiologie in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Hentschel.

### Promotionsstudium

seit Jan. 2002      Dissertation zum Thema: „Bakterielle Aufnahme, Selektivität und interne Prozessierung bei marinen Schwämmen (*Porifera*)“ am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. U. Hentschel.