

**Physiologie, Phylogenie und metagenomische
Analyse Ammoniak-oxidierender
Bakterien und Archaeen im
Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba***

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Kristina Bayer
aus
Kriebethal

Würzburg, Mai 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

1. Gutachter: PD Dr. Ute Hentschel

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Riederer

ERKLÄRUNG

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

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Des Weiteren erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben habe, noch zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 30.05.2008

(Kristina Bayer)

Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Ute Hentschel für die Vergabe dieses hochinteressanten Themas, das Vertrauen, das sie in mich setzte und die unermüdlichen Bestrebungen, diese Arbeit immer noch ein Stück besser zu machen.

Des Weiteren möchte ich Prof. M. Riederer für die Übernahme des Zweitgutachtens und in seiner Funktion als Sprecher des SFB 567, für die finanzielle Unterstützung danken. Die zahlreichen Exkursionen, die den Erfolg dieser Arbeit ausmachen, wären sonst nicht möglich gewesen.

Prof. J. H. Hacker als ehemaligen und Prof. M. Frosch als kommissarischen Leiter des Zentrums für Infektionsforschung danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Großer Dank gilt auch zahlreichen Kooperationspartnern, die erheblich am Erfolg dieser Arbeit beteiligt waren: Prof. F. Brümmer und M. Pfannkuchen sowie ihren Kollegen vom Biologischen Institut der Universität Stuttgart für die tatkräftige Unterstützung bei den Freilandarbeiten und die Versorgung mit stets ‚frischen‘ Schwämmen; Dr. F. Hoffmann vom MPI Bremen für die sehr gute und fruchtbare Zusammenarbeit; Prof. R. Batel sowie dem gesamten Team am Institut ‚Ruđer Bošković‘ (Kroatien) für die Unterstützung während der Expeditionen und die Möglichkeit, Experimente vor Ort durchzuführen; Prof. W.E.G. Müller danke ich für die Unterstützung innerhalb des Kompetenzzentrums BIOTECmarin.

Bei meinen Kollegen im Labor möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen interessanten Diskussionen, die Hilfe bei der Erstellung meiner Arbeit und die fröhlichen Stunden bedanken. Besonders zu nennen sind: Alexander für seinen nicht schwindenden Humor; Sheila für ihre stete Bereitschaft, englische Texte zu korrigieren; Hilde für ihre unerschütterliche Lebensfreude und ihren Optimismus; Paula für den Schuss kolumbianisches Temperament und Daniela, als einzige die mit Alex' Humor mithalten kann. Christine möchte ich besonders für ihre jahrelange Unterstützung bei allen Problemen und Fragen im Labor danken. Bei allen anderen Kollegen des ZINF und IMIB bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit und Atmosphäre im Haus. Auch den ehemaligen Kollegen, Lars, Markus, Lubo, Matthias und Susanne, von denen ich viel lernen durfte, möchte ich danken.

Ganz besonderer Dank gilt allen meinen Freunden ‚zu Hause‘ und hier in Würzburg. Meinen Eltern danke ich von Herzen für die jahrelange Unterstützung meiner Ausbildung, Michael und Ramona für Sonnenschein Tamina und ihr für das Lachen, dass sie hoffentlich nie verliert.

1	Zusammenfassung	10
	Summary	12
2	Einleitung	14
2.1	Schwämme - das Phylum Porifera	14
2.1.1	Taxonomie	15
2.1.2	Morphologie und Physiologie	15
2.2	Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme	17
2.2.1	Bakterienhaltige und bakterienfreie Schwämme	17
2.2.2	Das Schwamm-spezifische mikrobielle Konsortium	18
2.2.3	Mögliche Interaktionen zwischen Schwämmen und Mikroorganismen	20
2.3	Mikrobielle Nitrifikation	22
2.3.1	Die Bedeutung der Nitrifikation im Stickstoffkreislauf	22
2.3.2	Physiologie	23
2.3.3	Phylogenie und Genetik	25
2.3.4	Hinweise für Nitrifikation in Schwämmen	26
2.4	Zielsetzung	27
3	Methoden	28
3.1	Lebensschwamm-Experimente	28
3.1.1	Probennahme	28
3.1.2	Experimente mit lebenden Schwämmen	30
	<i>Experimentelles Design</i>	30
	<i>Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts von Schwämmen</i>	32
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von anorganischen Stickstoffverbindungen im Inkubationswasser	32
	<i>Probennahme und Nachweise</i>	32
	<i>Ratenberechnung</i>	33
3.1.4	Gewinnung mikrobieller Biomasse aus frischem Schwammgewebe	33

3.2	Molekulare Methoden	34
3.2.1	Extraktion genomischer DNA	34
3.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.2.3	Klonierung von PCR-Produkten	35
	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	35
	<i>Herstellung elektrokompetenter E. coli-Zellen</i>	36
	<i>Elektroporation</i>	36
	<i>Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse</i>	36
	<i>Plasmid-Mini-Präparation</i>	37
	<i>Sequenzierung</i>	36
3.2.4	„Screening“ der Metagenombank APAE02	38
	<i>Beschreibung der Metagenombank APAE02</i>	38
	<i>Präparation rekombinanter Fosmide aus „pools“</i>	38
	<i>Identifizierung einzelner Klone</i>	38
	<i>Sequenzierung von Fosmidklonen</i>	39
3.2.5	Southern-Blot-Analyse	39
	<i>Kapillarblot auf eine Nylonmembran</i>	39
	<i>Nicht-radioaktive Sondenmarkierung</i>	40
	<i>Hybridisierung, Waschen und Entwicklung</i>	40
3.2.6	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	40
	<i>Fixierung</i>	40
	<i>Hybridisierung</i>	41
	<i>Auswertung am Mikroskop</i>	41
3.3	Phylogenetische Stammbaum-Berechnungen	42
3.3.1	Sequenz-Alignments	42
3.3.2	Phylogenetische Auswertung	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Experimente mit lebenden Schwämmen	43
4.1.1	Jahreszeitliche Temperaturschwankungen im Mittelmeer	43
4.1.2	Bestimmung der Frischgewicht- /Trockengewicht-Korrelation	44
4.1.3	Ammonium- und Nitratausscheidung in <i>Aplysina aerophoba</i>	44
4.1.4	Einfluss der Hälterungsdauer	46

4.1.5	Hemmung der Nitratausscheidung durch Zugabe eines Inhibitors	47
4.1.6	Hemmung der Pumpaktivität	48
4.1.7	Hemmung weiterer mikrobieller Stickstoff-Stoffwechselwege	51
4.1.8	Ammonium- und Nitratausscheidung in anderen Schwammarten	52
4.1.9	Saisonabhängige Ammoniumaufnahme in <i>A. aerophoba</i>	54
4.1.10	Hemmung der Ammoniumaufnahme durch Inhibitor	56
4.1.11	Ammoniumaufnahme in anderen Schwammarten	57
4.2	Molekularer Nachweis Ammoniak-oxidierender Bakterien und Archaeen in Schwämmen	58
4.2.1	Bakterielle 16S rRNA-Gene	58
4.2.2	Bakterielle <i>amoA</i> -Gene	61
4.2.3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung Ammoniak-oxidierender Bakterien	63
4.2.4	Archaeale 16S rRNA-Gene	64
4.2.5	Archaeale <i>amoA</i> -Gene	65
4.2.6	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung Ammoniak-oxidierender Archaeen	67
4.2.7	Weitere 16S rRNA- und funktionelle Gene des mikrobiellen Stickstoffkreislaufs	68
4.3	Metagenomische Analysen	68
4.3.1	Screening einer Metagenombank auf bakterielle und archaeale 16S rRNA sowie Ammoniak-Monooxygenase-Gene (<i>amoA</i>)	68
4.3.2	Annotation des <i>Nitrosospira-amoA</i> -positiven Klons 4L5	69
4.3.3	Annotation des <i>Nitrosospira-amoA</i> -positiven Klons 8N3	71
4.3.4	Southern-Blot-Analyse des Klons 8N3	73
4.3.5	Annotation des <i>Crenarchaea-amoA</i> -positiven Klons 58F6	74
5	Diskussion	78
5.1	Die Physiologie der mikrobiellen Nitrifikation in marinen Schwämmen	78
	<i>Ammonium- und Nitratausscheidung</i>	78
	<i>Saisonale Variabilität</i>	80
	<i>Hemmung durch Inhibitor</i>	83
	<i>Einfluss der Pumpaktivität auf Ammonium- und Nitratexkretion</i>	83
	<i>Stimulation der Nitrifikation durch Ammonium</i>	85

5.2	Die Phylogenie bakterieller und archaealer Nitrifizierer in marinen Schwämmen	86
	<i>Nitrospira</i>	86
	<i>Crenarchaea</i>	88
5.3	<i>In-situ</i> Nachweis Ammoniak-oxidierender Mikroorganismen und die Berechnung Zell-spezifischer Ammoniak-Oxidationsraten	90
5.4	Funktionsanalyse unkultivierbarer nitrifizierender Mikroorganismen mittels Metagenomik	91
5.5	Modell der Stoffflüsse und des Stickstoffkreislaufs in <i>Aplysina aerophoba</i>	93
6	Ausblick	96
7	Anhang	98
7.1	Abkürzungsverzeichnis	98
7.2	Geräte, Materialien, Chemikalien, Kits, Programme	101
7.3	Lösungen, Medien und Puffer	106
7.4	Verwendete Mikroorganismen	112
7.5	Verwendete Oligonukleotide	112
8	Referenzen	116
9	Publikationen und Tagungsbeiträge	128
10	Forschungsaufenthalte	129
11	Lebenslauf	130

1 Zusammenfassung

Marine Schwämme (Phylum Porifera) sind sessile Invertebraten, deren Biomasse bis zu 60% aus Mikroorganismen bestehen kann. Während die mikrobielle Diversität in Schwämmen in den letzten Jahren recht gut beschrieben wurde, weiß man noch sehr wenig über mögliche Funktionen und Interaktionen zwischen Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mit ihren Wirten. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, den Prozess der mikrobiellen Nitrifikation im bakterienhaltigen Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba* nachzuweisen und im Kontext der Symbiose näher zu untersuchen. Die Nitrifikation beschreibt die zweistufige Oxidation von Ammoniak zu Nitrit und weiter zu Nitrat und wird von bestimmten Mikroorganismen zur Energiegewinnung durchgeführt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden physiologische Untersuchungen an lebenden Schwämmen während Freilandexkursionen nach Rovinj (Kroatien) durchgeführt. Frisch gesammelte Schwämme wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten in experimentellen Aquarien jeweils über einen Zeitraum von über 24 Stunden gehältert. Die Konzentrationen von Ammonium, Nitrit und Nitrat wurden in Zeitintervallen mittels photometrischer Nachweise gemessen und die Aufnahme- und Exkretionsraten berechnet. Nitrit wurde in keinem der Experimente messbar ausgeschieden. Ammonium, als natürliches Stoffwechselendprodukt mariner Schwämme, wurde von *A. aerophoba* in Raten ausgeschieden, die saisonal variabel waren. Im Frühjahr wurde keine Ammoniumausscheidung beobachtet während die Exkretionsrate zum Sommer hin stetig anstieg. Nitrat, welches natürlicherweise nur durch mikrobielle Nitrifikation entstehen kann, wurde saisonunabhängig konstant ausgeschieden. Ammoniumaufnahme-Experimente zeigten auf, dass Ammonium im Frühjahr rasch aufgenommen wurde und dass Ammonium die Nitratexkretionsrate bis zu vierfach stimulierte, wohingegen im Sommer keine Ammoniumaufnahme und keine Stimulation der Nitratexkretion stattfanden. Durch Zugabe des spezifischen Inhibitors der Nitrifikation, Nitrapyrin, konnte die Nitratexkretion in *A. aerophoba* vollständig gehemmt werden. Im Gegensatz zu bakterienhaltigen Schwämmen zeigten sogenannte bakterienfreie Schwämme erwartungsgemäß keine Nitratausscheidung.

Das 16S rRNA- und das *amoA*-Gen wurden als molekulare Marker verwendet, um nitrifizierende Mikroorganismen in Schwämmen phylogenetisch zu identifizieren. Es konnten zahlreiche 16S rRNA-Gene aus insgesamt sechs Schwammarten inklusive *Aplysina aerophoba* amplifiziert und dem marinen *Nitrosospora* Cluster 1 zugeordnet werden. Aus *A.*

aerophoba konnten auch *Nitrosospira amoA*-Gensequenzen gewonnen werden. Archaeale 16S rRNA- und *amoA*-Gensequenzen wurden ebenfalls aus *A. aerophoba* gewonnen, wobei die 16S rRNA-Gene mit anderen aus Schwämmen stammenden Sequenzen ein Schwamm-spezifisches Cluster innerhalb der *Crenarchaea* Gruppe I.1A bildeten. Unter Verwendung spezifischer Fluoreszenz-markierter 16S rRNA Sonden konnten den *Nitrosospira* Cluster 1 und *Crenarchaea* Gruppe 1 zugehörige Zellen innerhalb des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* nachgewiesen werden. Basierend auf der geschätzten Menge nitrifizierender Mikroben in der Schwamm-mesohylmatrix und den Nitratexkretionsraten wurde eine zellspezifische Ammoniakoxidationsrate von $1,6 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ errechnet. Der Nachweis von 16S rRNA- oder funktionellen Genen des anaeroben mikrobiellen N-Kreislaufs in *A. aerophoba* verlief negativ. Darüber hinaus wurde eine in vorherigen Arbeiten aus dem mit *A. aerophoba* assoziierten mikrobiellen Konsortium erstellte Metagenombank auf das Vorhandensein von funktionellen (*amoA*) *Nitrosospira*- und *Crenarchaea*-Genen untersucht. Aus der Sequenzierung des archaealen Metagenomklons 58F6 resultierte die Sequenz des kompletten AMO-Operons eines möglicherweise Schwamm-spezifischen Crenarchaeoten.

Diese Ergebnisse liefern erste funktionelle Einblicke in die komplexen Stoffflüsse und Wechselwirkungen zwischen Schwämmen und den mit ihnen assoziierten mikrobiellen Konsortien. Aufgrund dieser Arbeit wurde ein Modell des Stickstoffkreislaufs in *A. aerophoba* erstellt, welches die Mikroorganismen mit möglichen Stoffwechselfunktionen in dem Wirtsschwamm verknüpft. Diese Arbeit trägt zu dem Informationsstand über die Interaktionen zwischen Schwämmen und Mikroorganismen bei und leistet einen Beitrag zur Aufklärung des Stickstoffkreislaufs in *A. aerophoba*.

Summary

Marine sponges (phylum Porifera) can harbor large amounts of microorganisms which can contribute up to 60% of the sponge biomass. While the microbial diversity has been well described in the last decade, there is only little known about possible functions and metabolic interactions of these microbes with their hosts. The aim of this Ph.D. thesis was to assess and investigate the potential for microbial nitrification in the Mediterranean high microbial abundance sponge (HMA) *Aplysina aerophoba*. Nitrification consists of the two-step oxidation of ammonia to nitrite and subsequently to nitrate and is carried out by certain microbes for energy purposes. Physiological experiments with living sponges were performed during several expeditions to Rovinj (Croatia). Freshly sampled sponges were incubated in experimental aquaria for more than 24 hours during different seasons. Concentrations of ammonium, nitrite and nitrate were determined in time intervals using colorimetric assays and the excretion- and uptake rates were determined. Nitrite was not excreted in any of the incubation experiments. Ammonium as the natural metabolic waste product of marine sponges was excreted by *A. aerophoba* and the excretion was seasonally variable. During spring ammonium excretion was not observed, but the excretion rates increased towards the summer. Nitrate which is solely produced by microbial nitrification was excreted constantly and independent of the season. Ammonium uptake experiments proved that ammonium was taken up rapidly in spring and nitrate excretion was stimulated up to 4-fold. During summer no ammonium uptake by *A. aerophoba* was observed and nitrate excretion was not stimulated. Addition of the specific inhibitor of nitrification, nitrapyrin, resulted in the complete inhibition of nitrate excretion. In contrast to high microbial abundance sponges, nitrate was not excreted by low microbial abundance sponges as expected.

The 16S rRNA gene as well as the *amoA* gene was used as molecular markers to phylogenetically identify microbial nitrifiers in sponges. Numerous 16S rRNA gene sequences representing the marine *Nitrosospira* cluster 1 were obtained from six sponge species including *Aplysina aerophoba*. *Nitrosospira amoA* genes and archaeal 16S rRNA and *amoA* gene sequences were also amplified from *Aplysina aerophoba*. The archaeal 16S rRNA gene sequences formed a sponge-specific sub-cluster within the *Crenarchaea* group I.1A together with other, exclusively sponge-derived sequences. Using fluorescently-labeled 16S rRNA probes targeting the *Nitrosospira* cluster 1 and the *Crenarchaea* group 1, their presence

was confirmed in *A. aerophoba* mesohyl. Based on nitrifier abundance in sponge tissues as estimated by FISH and nitrate excretion rates, a cell specific ammonia oxidation rate of $1.6 \text{ fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ was calculated. No 16S rRNA or functional genes representing microbes of the anaerobic part of the N-cycle were obtained from *A. aerophoba*. Furthermore, a previously constructed metagenomic library containing DNA from *A. aerophoba* associated microbial consortia was screened for clones harboring functional (*amoA*) genes from *Nitrosospira* and *Crenarchaea*. Sequencing of the archaeal clone 58F6 resulted to a complete AMO operon of a possible sponge specific crenarchaeote.

The results of this dissertation thesis provide first insights into the complex nitrogen fluxes and interactions between sponges and their associated microbial consortia. Based on this study, a model of N-cycle was postulated for *A. aerophoba* which links microbial diversity with possible metabolic functions. This study contributes significantly to sponge-microbial interactions and adds new information about the nitrogen cycle in *A. aerophoba* and its associated microorganisms.

2 Einleitung

2.1 Schwämme - das Phylum Porifera

Das Phylum Porifera ist der älteste rezente Tierstamm der Erde. Fossilfunde belegen das evolutionär hohe Alter von 580 Mio. Jahren (Li *et al.* 1998). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind über 7,000 Schwammarten beschrieben, allerdings rechnen Wissenschaftler mit ca. 15,000 existierenden Arten weltweit (Hooper und van Soest 2002). Schwämme zeichnen sich durch ihre große Farben- und Formenvielfalt aus (Abb. 2-1). Aufrechte Wuchsformen mit zylindrischen Schloten sind ebenso zahlreich zu finden wie eher flache, langgestreckte Formen bis hin zu inkrustierenden Arten, die nur wenige Millimeter hoch sind. Schwämme sind sessile Tiere, sie sind stark mit dem Substrat verwachsen und können sich bis auf wenige Ausnahmen nicht von ihrem Standort wegbewegen. Sie besiedeln alle aquatischen Habitate inklusive Süßwasserseen, Flüsse, den arktischen Gewässern bis hin zur Tiefsee. Die größte Vielfalt findet man jedoch in den tropischen und subtropischen Weltmeeren, wo Schwämme neben Korallen wichtige Riffbildner sind. Trotz des erdgeschichtlich hohen Alters von Schwämmen weisen diese bereits einige Merkmale höherer Tiere auf, wie z. B. die Regenerationsfähigkeit dissoziierter Schwammzellen oder Abwehrreaktionen des Gewebes, was eine einfache Form eines Immunsystems darstellt (Müller und Müller 2003, Wiens *et al.* 2005).

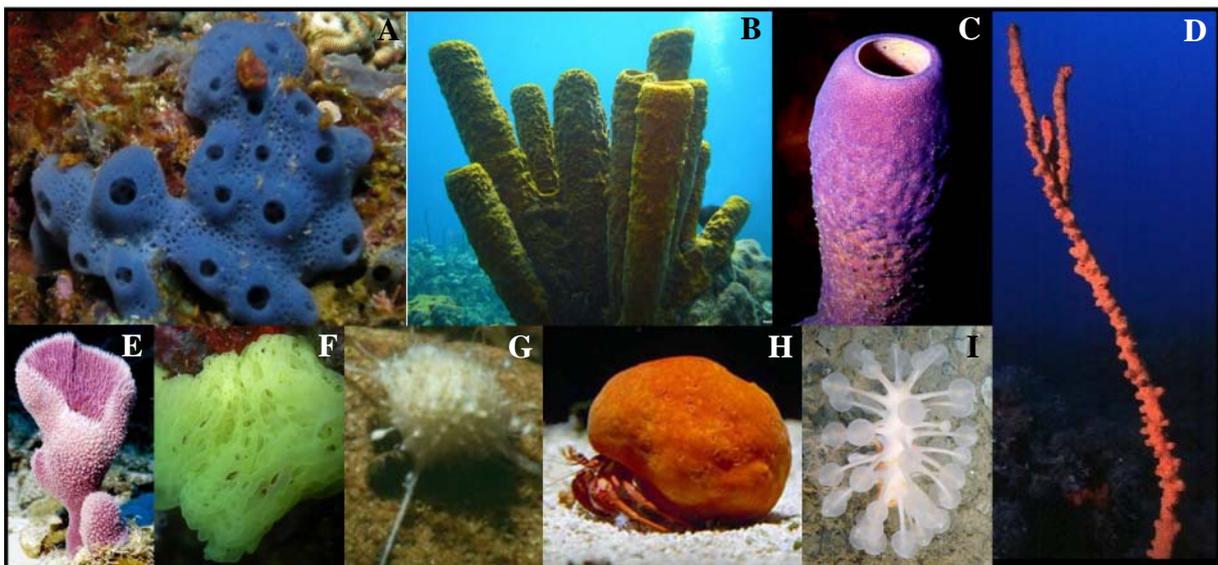


Abbildung 2-1: Beispiele für die Formen- und Farbenvielfalt mariner Schwämme. *Haliclona* sp. (A), *Aplysina archeri* (B), *Aplysina lacunosa* (C), *Axinella* sp. (D), *Niphates digitales* (E), *Clathrina clathrus* (F), *Tethya wilhelma* (G), *Suberites domuncula* (H), *Chondrocladia* sp. (I). (diverse Quellen: Internet).

Schwämme stellen ein enormes Repertoire an Sekundärmetaboliten mit antibakteriellen, antiviralen, fungiziden, Malaria- oder Krebshemmenden oder zytotoxischen Wirkungen bereit und ziehen damit das wissenschaftliche Interesse auf sich (zusammengefasst in Lee *et al.* 2001, Sipkema 2004, Proksch *et al.* 2003, Blunt *et al.* 2006). Diese Stoffe werden vermutlich zur Abwehr von Fraßfeinden, zur Vermeidung von bakteriellen Infektionen, Biofouling oder des Überwachsens durch andere sessile Tiere gebildet (McClintock und Baker 2001, Paul *et al.* 2006, Thoms *et al.* 2006). Während viele hochinteressanten Wirkstoffe vom Schwamm selbst produziert werden (Garson *et al.* 1994, Uriz *et al.* 1996, Müller *et al.* 2004), geht man bei anderen Metaboliten von einem mikrobiellen Ursprung bzw. von einer nicht unerheblichen Beteiligung von Mikroorganismen bei der Synthese aus (Osinga *et al.* 2001, Proksch *et al.* 2003).

2.1.1 Taxonomie

Das Phylum Porifera umfasst drei klar definierte taxonomische Klassen, die sich u. a. durch die Art der ausgebildeten Skelettelemente (Spiculae, Sklerite) unterscheiden; Die Kalkschwämme (Calcarea) zeichnen sich durch Sklerite aus, die aus Calciumkarbonat bestehen. Bei der Klasse der Kieselschwämme (Hexactinellida) bestehen die Spiculae aus Kieselsäurenadeln (Silikat). Die Mehrzahl aller heute vorkommenden Schwammarten (ca. 85 %) inklusive der Süßwasserschwämme gehört der Klasse der Hornkieselschwämme (Demospongiae) an, die Proteinfasern (Spongin) oder aber zusätzliche Silikat-Spiculae zur Stabilisierung des Schwammkörpers bilden. Neben den genannten rezenten Klassen gibt es eine Reihe fossiler Schwämme, die in der Klasse Archaeocantha zusammengefasst werden (Hooper und van Soest 2002).

2.1.2 Morphologie und Physiologie

Schwämme weisen eine einfache Morphologie auf und haben in ihrer Organisationsstufe noch keine echten Organe oder Gewebe ausgebildet (Abb. 2-2 A). Man unterscheidet bei Schwämmen die äußere Schicht (Pinacoderm) und die innere Schicht (Choanoderm). Zwischen diesen beiden Abschlusschichten befindet sich das Mesohyl, das aus einer sehr massiven extrazellulären Matrix (ECM) besteht. Schwämme sind größtenteils Nahrungsstrudler oder Suspensionsfiltrierer mit der Ausnahme der karnivoren Schwämmen aus der Tiefsee. Für die Filtration wird das Umgebungswasser durch unzählige auf der Schwammoberfläche

befindliche Dermalporen (Ostien) eingesaugt und durch das Kanalsystem geleitet, welches das Schwammgewebe netzartig durchzieht (Abb. 2-2 B). Je nach Grad der Verzweigung des Kanalsystems unterscheidet man drei Organisationstypen (Ascon-, Sycon- und Leucontyp). In den Wasserkanälen befinden sich Choanozytenkammern, die von Kragengeißelzellen (Choanozyten) ausgekleidet sind. Diese Choanozyten erzeugen einen kontinuierlichen, gerichteten Wasserstrom durch das Schwammesohyl (Abb. 2-2 B, C). Nahrungspartikel, vor allem Mikroorganismen aber auch Algen oder Detritus, werden von Choanozyten ins Mesohyl aufgenommen. Im Mesohyl erfolgt die Verdauung dann entweder durch Choanozyten, welche die vorverdauten Partikel an Archaeozyten weitergeben oder direkt durch Archaeozyten in einer Art Futtervakuole (Brusca und Brusca 1990). Durch ihre enorme Filterleistung decken Schwämme den größten Teil der benötigten Energie ab (Reisig 1971, Pile 1997, Ribes *et al.* 1999, Wehrl *et al.* 2007, Jiménez und Ribes 2007). Der Prozess des Filtrierens durch Schwämme ist sehr effektiv. Das über die zentralen Ausstromöffnungen (Oskulum) wieder ausgestrudelte Wasser ist nahezu steril (Wehrl 2001). Durch die enorme Pumpleistung prozessieren marine Schwämme in einer Minute Wassermassen, die das eigene Körpervolumen um ein Vielfaches übertreffen (Reiswig 1971, Yahel *et al.* 2003, Osinga *et al.* 2003, Wehrl 2006).

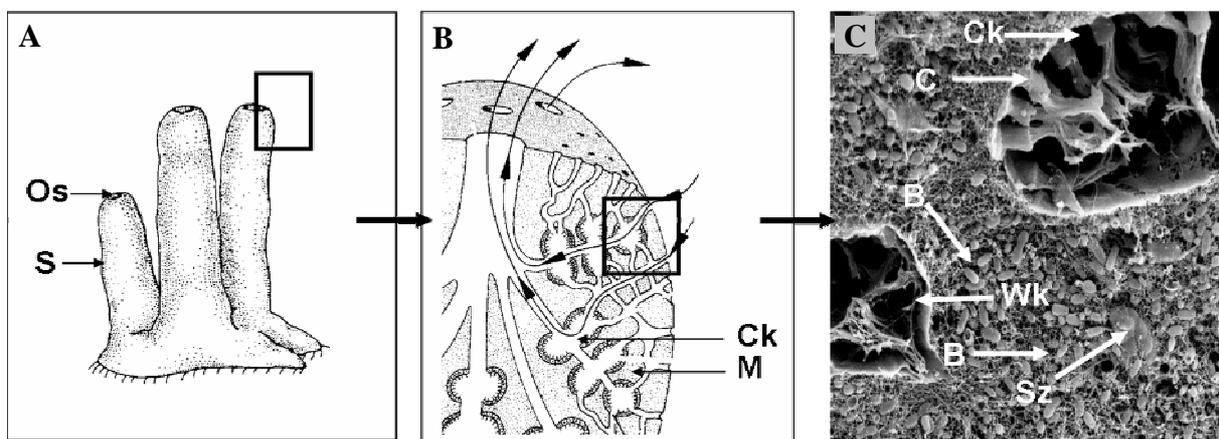


Abbildung 2-2: Morphologischer Aufbau eines typischen Schwammes (A, B). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Mesohyls von *A. aerophoba*. Os: Oskulum, S: Schlot, M: Mesohyl, extrazelluläre Matrix, Ck: Choanozytenkammer, C: Choanozyt mit Cilie, B: Bakterien, Wk: Wasserkanal, Sz: Schwammzelle (Quellen: Brusca und Brusca 1990, Hentschel *et al.* 2003).

Die in der ECM eingebetteten frei beweglichen Schwammzelltypen erfüllen zahlreiche Funktionen. Der wohl vielfältigste Zelltyp sind die totipotenten Archaeozyten, die sich praktisch in jeden anderen Zelltyp differenzieren können. Diese Zellen sind neben der bereits erwähnten Aufnahme (Phagozytose) und Verdauung von Nahrungspartikeln auch für deren Transport

sowie die Ausscheidung von Abfallprodukten zuständig. Auch die Fortpflanzung, d. h. die Bildung von reproduktiven Zellen (Oocyten) oder Dauerstadien (Gemmulae) sind Aufgaben der Archaeozyten. Spermien dagegen werden vermutlich von Choanozyten gebildet (Brusca und Brusca 1990). Das Ausscheiden von Stoffwechselendprodukten (in der Regel Ammonium) sowie der Gasaustausch geschehen bei Schwämmen durch einfache Diffusionsprozesse (Brusca und Brusca 1990). Die zur Stabilisierung des Schwammkörpers gebildeten Skelettelemente (Kapitel 2.1.1) werden von spezialisierten Zellen gebildet (Collenzyten, Spongozyten und Sklerozyten). In den in transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen häufig als sehr elektronendicht erscheinenden Speicherzellen werden vermutlich Sekundärmetabolite und Abfallprodukte gelagert.

2.2 Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme

2.2.1 Bakterienhaltige und bakterienfreie Schwämme

Bereits in den frühen 70'er Jahren wurde mit Hilfe der Mikroskopie erkannt, dass viele marine Schwämme mit Mikroorganismen assoziiert sind (Vacelet 1970, 1971, 1975). Diese Mikroorganismen können bis zu 60 % des Gesamtvolumens vieler mariner Schwämme ausmachen, was 10^8 - 10^9 Zellen pro g Frischgewicht bzw. ml Schwammextrakt entspricht (Friedrich *et al.* 2001, Webster und Hill 2001, Hentschel *et al.* 2006). Diese Schwämme werden deshalb häufig als ‚Bakterienchwämme‘ (‚bacteriosponges‘ oder ‚high-microbial-abundance sponges‘) bezeichnet [(Abb. 2-3 A) Hill 2004, Hentschel *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007)]. Die Mikroorganismen liegen meist frei in der extrazellulären Matrix (ECM) des Mesohyls vor. Allerdings wurden vereinzelt sowohl intrazelluläre als auch intranukleäre Mikroorganismen beobachtet (Vacelet 1970, Wilkinson 1978c, Friedrich *et al.* 1999). Eine Symbiose, an denen zahlreiche Partner beteiligt sind, wie das Zusammenleben mariner Schwämme mit einem phylogenetisch komplexen mikrobiellen Konsortium (siehe Kapitel 2.3.2), macht allerdings auch die Herausforderung aus, diese Lebensgemeinschaften zu untersuchen und zu verstehen.

Es existieren hingegen auch Schwämme, deren Mesohyl visuell bakterienfrei ist (Abb. 2-3 B, Hentschel *et al.* 2006, Wehrl 2006, Schmitt *et al.* 2007a) und molekulare Studien zeigten, dass die mikrobielle Diversität dieser Schwämme der des Meerwassers entspricht (Schiller R.

2006). Das spiegelt sich auch in der Anzahl der Mikroorganismen wider [10^5 - 10^6 Zellen pro g Frischgewicht Schwamm (Hentschel *et al.* 2006)]. Diese Schwämme werden deshalb häufig als bakterienfrei oder ‚low-microbial-abundance sponges‘ bezeichnet (Hentschel *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007).

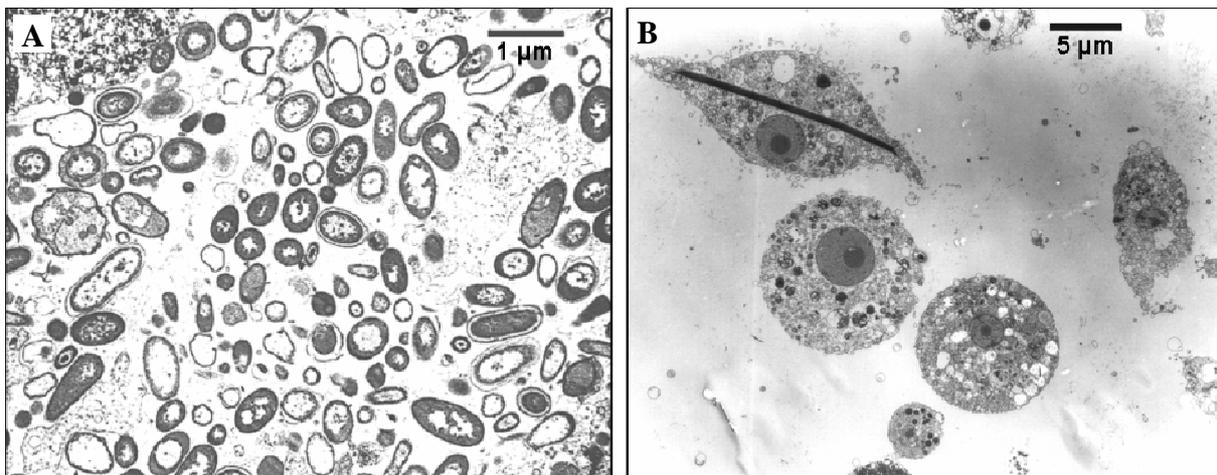


Abbildung 2-3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen vom Mesohyl des bakterienhaltigen Schwamms *Aplysina carvernicola* (A, Friedrich *et al.* 1999) und des bakterienarmen Schwamms *Niphates digitales* (B, Schmitt *et al.* 2007).

2.2.2 Das Schwamm-spezifische mikrobielle Konsortium

Viele Schwämme sind mit einem phylogenetisch diversen, stabilen und hochgradig Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortium assoziiert. (Hentschel *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2007, Ereskovsky *et al.* 2005, Schmitt *et al.* 2007b). Der Begriff ‚Schwamm-spezifisch‘ wurde von Hentschel *et al.* (2002) geprägt und beschreibt ein phylogenetisches Cluster, das mindestens drei (16S rRNA-) Gensequenzen beinhaltet, die aus (i) unterschiedlichen Schwammspezies und/oder aus unterschiedlichen geografischen Regionen stammen, die (ii) untereinander näher verwandt sind als zu anderen Umwelt-Sequenzen und die (iii) unabhängig von der verwendeten Methode zur phylogenetischen Stammbaumberechnung ein Cluster bilden. Mittlerweile existiert ein recht umfangreicher Datensatz von mehr als 1600 16S rRNA-Gensequenzen aus Schwämmen. Das Schwamm-spezifische mikrobielle Konsortium ist äußerst divers (Hentschel *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007). Molekularbiologische Methoden zur Diversitätsbeschreibung (PCR, DGGE, FISH) ergaben, dass Vertreter aus mindestens 11 bakteriellen Phyla zum spezifischen mikrobiellen Konsortium von Schwämmen gehören. Proteobakterien (Alpha-, Gamma- und Deltaproteobakterien), Cyanobakterien, Chloroflexi,

Nitrospira, Gemmatimonadetes, Acidobakterien, Actinobakterien, Bacteroidetes, Firmicutes, Spirochaetes, Verrucomicrobia und ein archaeales Phylum (Crenarchaeota) beinhalten Schwamm-spezifische Cluster (Abb. 2-4, Schmitt und Hentschel 2008). Besonders hervorzuheben sind die erst kürzlich entdeckten ‚*Poribacteria*‘, die bis dato ausschließlich in marinen Schwämmen gefunden wurden und deren 16S rRNA-Gen weniger als 75 % Sequenzähnlichkeit zu ihren nächsten Verwandten (Planctomycetales) aufweisen und somit ein sehr tiefzweigendes neues *Candidatus* Phylum bilden (Fieseler *et al.* 2004).

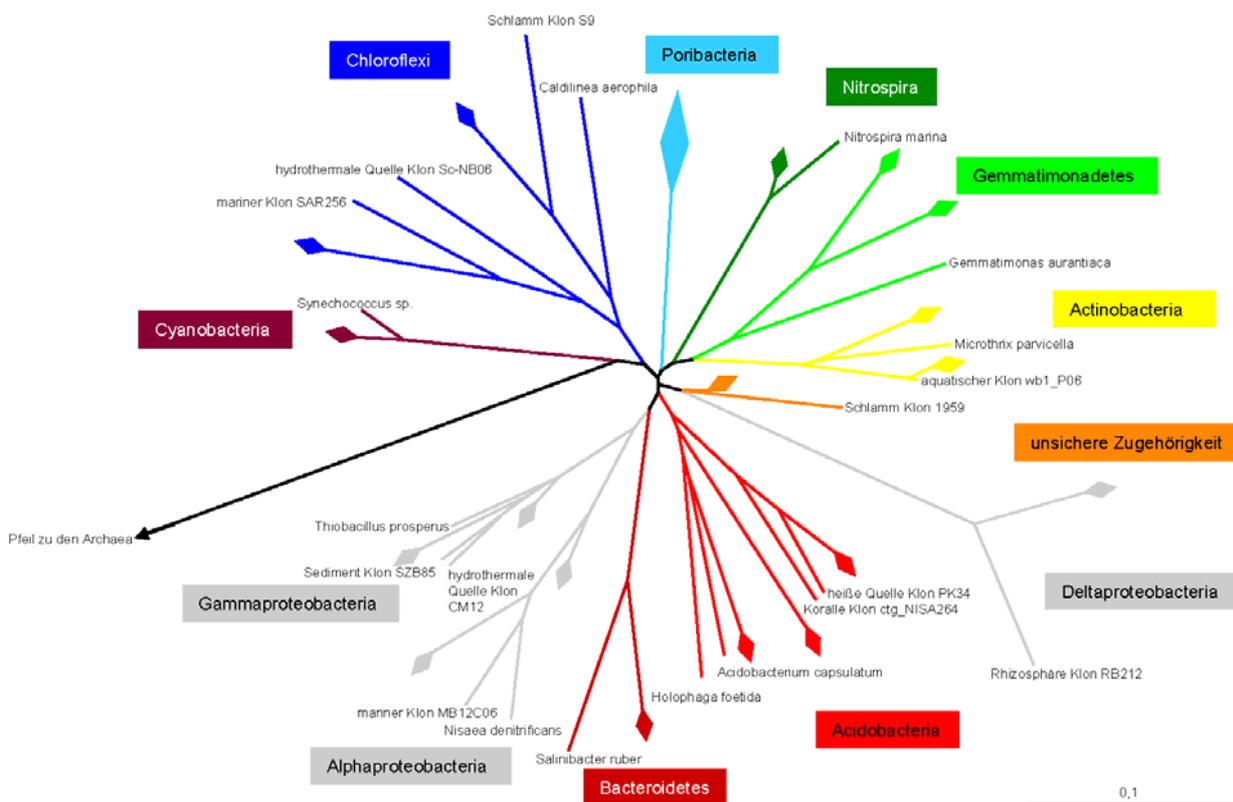


Abbildung 2-4: Phylogenetischer Stammbaum zur Darstellung der mikrobiellen Diversität in marinen Schwämmen. Rauten beschreiben Schwamm-spezifische Cluster und beinhalten jeweils mehrere aus Schwämmen stammende Sequenzen (Quelle: Schmitt und Hentschel 2008).

Die im Mesohyl vieler mariner Schwämme vorkommenden Mikroorganismen sind zu > 99 % nicht kultivierbar und entziehen sich jeglichen Untersuchungen über mögliche Funktionen. Bei der Beschreibung der mikrobiellen Diversität komplexer mikrobieller Konsortien wie z. B. dem aus marinen Schwämmen stellte in der jüngeren Vergangenheit hauptsächlich die

Verwendung des 16S rRNA-Gens ein hilfreiches Instrument dar (Hentschel *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003). Bei der funktionellen Charakterisierung unkultivierbarer Mikroorganismen stellt die moderne Methode der Metagenomik einen sehr nützlichen Ansatzpunkt dar (Fieseler *et al.* 2006, Kimura 2006, Grozdanov und Hentschel 2007). Das Ablegen mikrobieller DNA in geeignete Vektoren und Wirtsbakterien sowie das anschließende Screening nach Markergenen kann erste Einblicke in mögliche Funktionen oder Stoffwechselwege der entsprechenden Mikroorganismen geben. So gelang die Beschreibung des ersten genomischen Fragments eines Vertreters des ausschließlich in Schwämmen vorkommenden *Candidatus* Phylums Poribacteria (Fieseler L. 2005, Fieseler *et al.* 2006). Auch das crenarchaeale Potential zur Nitrifikation wurde durch die Analyse einer Metagenombank entdeckt (Treusch *et al.* 2005). In dieser Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft einer Bodenprobe wurde ein Klon archaealen Ursprungs identifiziert, der zwei Gene mit Homologien zu den bakteriellen AmoA und AmoB enthielt (Treusch *et al.* 2005).

2.2.3 Mögliche Interaktionen zwischen Schwämmen und Mikroorganismen

Weniger als 1 % der in der Umwelt vorkommenden Mikroorganismen können unter Laborbedingungen kultiviert werden (Amann *et al.* 1995, Rappé und Giovannoni 2003, Kimura 2006). Bei den meisten Mikroorganismen beschränken sich die Erkenntnisse über mögliche physiologische Eigenschaften auf Rückschlüsse aus der phylogenetischen Zugehörigkeit (Schumann-Kindel *et al.* 1996, Manz *et al.* 2000, Hentschel *et al.* 2002), durch die Amplifikation bestimmten funktioneller Gene (Scheuermayer 2006, Grozdanov und Hentschel 2007) oder Analysen von Metagenombanken (Venter *et al.* 2004, Treusch *et al.* 2005, Fieseler *et al.* 2006, Scheuermayer 2006). Auch der Großteil des Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortiums ist bis jetzt nichtkultivierbar (Olson und McCarthy 2005). Nur in wenigen Fällen ist es gelungen, Interaktionen oder Stoffflüsse zwischen Schwämmen und Mikroorganismen aufzuklären. Scheinbar profitieren die Mikroorganismen durch die physiologische Abgrenzung zur Umwelt und zur Bereitstellung eines geschützten Habitats. Auch die Verfügbarkeit energiereicher Nebenprodukte als Nahrungs- und Energiequelle, welche durch die exzessive Phagozytoseaktivität von Schwämmen entstehen, ist für potentielle Symbionten von Vorteil (Osinga *et al.* 2001, Hentschel *et al.* 2006). Weiterhin könnten Mikroorganismen an der Verwertung von Abfallprodukten beteiligt sein und somit einer Entgiftung dienen, wie im Fall der Rotalge *Ceratodictyon spongiosum* postuliert, die symbiontisch mit der Schwammart *Haliclona cymiformis* assoziiert ist (Davy *et al.* 2002). Die von Mikroorganismen gebildeten

Sekundärmetabolite dienen vermutlich der chemischen Verteidigung, um die Wirtsschwämme vor Fraßfeinden, dem Überwachsen durch Algen oder Fremdinfectionen zu schützen und sind von entscheidender Bedeutung für Schwämme in ihrer sessilen Lebensform.

Genauere physiologische Interaktionen von Schwämmen mit assoziierten Mikroorganismen sowie diese untereinander sind dagegen noch weitestgehend ungeklärt. Allein für die Cyanobakterien gibt es stichhaltige Hinweise auf symbiotische Interaktionen mit ihren Wirten. Wilkinson konnte die Abgabe von Kohlenstoff-haltigen Photosyntheseprodukten (Glukose oder Glycerin) von den phototrophen Mikroorganismen an den jeweiligen Wirtsschwamm nachweisen (Wilkinson 1979a, 1980), was den Schwämmen die Besiedelung nährstoffarmer, aber lichtintensiver Gewässer wie z.B. dem Great Barrier Reef ermöglicht. Bis zu 50% des Energiebedarfs eines Schwamms können durch die Aktivität von Cyanobakterien gedeckt werden. Zusätzlich konnte eine Produktion von Sauerstoff (O₂) sowie die Fixierung von Kohlendioxid (CO₂) in Riffschwämmen gezeigt werden (Wilkinson 1983). Auch der positive Einfluss von Photosynthese-aktiven Algen auf das Wachstum und den Stoffwechsel von Süßwasserschwämmen wurde postuliert (Frost und Williamson 1980, Wilkinson 1980, Sand-Jensen und Petersen 1994). Die Absorption des Sonnenlichts durch die bakteriellen Chlorophylle der größtenteils in der äußeren Schicht (Pinacoderm) der Schwämme vorliegenden Cyanobakterien und/ oder die erwiesene Fixierung von N₂ in einem Stickstoff-limitierten Habitat könnten ebenfalls von entscheidender Bedeutung in der Interaktion von Schwämmen und Cyanobakterien sein.

Im Gegensatz zu den phototrophen Mikroorganismen gibt es für die diversen im Mesohyl vieler Schwämme vorkommenden, vermutlich heterotrophen Bakterien, nur vereinzelt postulierte Szenarien zur Darstellung der Interaktion. Hoffmann und Kollegen (2005) konnten durch Messungen mit Mikroelektroden den anaeroben mikrobiellen Prozess der Sulfatreduktion in dem bakterienhaltigen Kaltwasserschwamm *Geodia baretii* nachweisen. Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gelang es auch, die dafür verantwortlichen Bakterien der Clade *Desulfoarculus/ Desulfomonile/ Syntrophus* zu identifizieren (Hoffmann *et al.* 2005). Auch in den bakterienhaltigen Mittelmeer-Schwämmen *Chondrosia reniformis* und *Petrosia ficiformis* wurden mittels FISH Sulfat-reduzierende Bakterien identifiziert. Die sehr hellen Fluoreszenz-Signale deuten dabei auf eine hohe Stoffwechselaktivität hin (Schumann-Kindel *et al.* 1997, Manz *et al.* 2000).

Eine ungewöhnliche Form der Assoziation gehen Tiefseeschwämme der Gattung *Cladorhiza* mit methanotrophen Bakterien ein. Die in nährstoffarmen Habitaten vorkommenden Schwämme sind mit zwei bakteriellen Morphotypen assoziiert, von denen zumindest eine Art fähig ist, durch die Oxidation von Methan Energie zu gewinnen (Vacelet und Boury-Esnault 1995, Vacelet *et al.* 1995, 1996). Diese Tiefseeschwämme fangen mit ihren Filamenten kleine Crustaceen aus dem Umgebungswasser, die dann innerhalb weniger Tage verdaut werden. Im Mesohyl dieser Schwämme konnten mikroskopisch intrazelluläre Bakterien in verschiedenen Degenerationsstadien beobachtet werden, sodass nicht auszuschließen ist, dass diese zusätzlich zu dem unter Schwämmen einzigartigen karnivoren Lebensstils, diese auch durch die Verdauung ihrer eigenen ‚Symbionten‘ einen Teil seines Energiebedarfs decken (Vacelet *et al.* 1996).

2.3 Mikrobielle Nitrifikation

2.3.1 Die Bedeutung der Nitrifikation im Stickstoffkreislauf

Sowohl in aquatischen wie auch in terrestrischen Systemen hat die mikrobielle Nitrifikation eine Schlüsselfunktion im Stickstoffkreislauf. In terrestrischen Habitaten ist die Bildung von Nitrat durch die Nitrifikation entscheidend, da essentieller Stickstoff in dieser Form bevorzugt von den Pflanzen aufgenommen wird. Allerdings wird Nitrat sehr viel stärker als Ammonium aus Böden ausgewaschen und führt so gleichzeitig zu einem möglichem Stickstoffverlust. In natürlichen aquatischen Systemen ist die mikrobielle Nitrifikation ein durchaus wünschenswerter Prozess. Ammonium und Ammoniak sind schon in niedrigen Konzentrationen für Fische und die meisten marinen Lebewesen toxisch (Gray *et al.* 2002). Zusätzlich ist Ammonium das Ausscheidungsprodukt fast aller mariner Invertebraten, Ammoniak das von Fischen und wird somit ständig nachgebildet. Viel Ammonium entsteht auch beim Abbau von Proteinen und organischem Material (Ammonifikation, Abb. 2-5). In natürlichen Gewässern ist die mikrobielle Nitrifikation als Teil der Selbstreinigung von großer Bedeutung und ganz entscheidend für die Wasserqualität. Eine schnelle Umsetzung von giftigem Ammoniak bewirkt also eine Entgiftung der Umwelt und wird auch bei der künstlichen Haltung von Fischen in Aquarien genutzt. In Kläranlagen wird die bakterielle Umsetzung von Ammoniak zu Nitrat, gekoppelt an eine anschließende Denitrifikation zur systematischen Stickstoffentfernung aus Abwässern genutzt (Abb. 2-5).

Entsprechend ihrer entscheidenden Rolle im globalen Stickstoffkreislauf sind bakterielle Nitrifizierer in terrestrischen wie auch in marinen Habitaten weitverbreitet. In den Ozeanen, Flüssen, Seen, Sedimenten, Bodenproben und Abwässern sind diese Mikroorganismen zu finden (zusammengefasst in Bock und Wagner 2006, Koops *et al.* 2006). Während das Vorkommen von Archaeen in der Umwelt schon länger bekannt ist (DeLong 1992), wurde erst kürzlich das Potential von Crenarcheen zur Ammoniak-Oxidation erkannt (Venter *et al.* 2004, Könneke *et al.* 2005, Treusch *et al.* 2005). RNA-basierte Studien zeigten, dass crenarchaeale Nitrifizierer in einer weitaus größerer Zahl in marinen Habitaten sowie Boden vorkommen und auch dementsprechend eine viel größere Rolle bei der Umsetzung von Ammoniak spielen als die Bakterien (Leininger *et al.* 2006, Wuchter *et al.* 2006, Lam *et al.* 2007, Mincer *et al.* 2007).

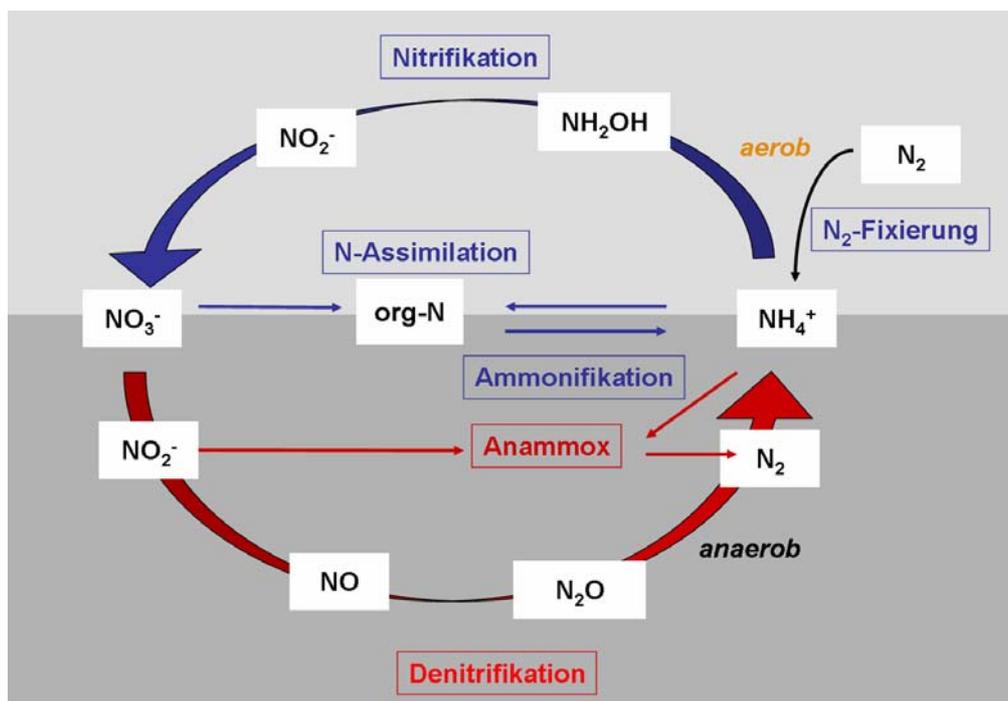


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege im globalen Stickstoffkreislauf.

2.3.2 Physiologie

Die mikrobielle Nitrifikation beschreibt die zweistufige Oxidation von Ammoniak (NH_3) zu Nitrit (NO_2^-) und weiter zu Nitrat (NO_3^-) zwecks Energiegewinnung. Die erste Umwandlung von Ammoniak zu Nitrit mit Hydroxylamin (NH_2OH) als Zwischenprodukt wird von Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB) durchgeführt [Abb. 2-6 (Kowalchuk and Stephen, 2001,

Koops *et al.* 2006, Bock und Wagner 2006)]. Das Schlüsselenzym der Ammoniak-Oxidation ist die transmembrane Ammoniak-Monooxygenase (AMO), welche Ammoniak unter aeroben Bedingungen zu Hydroxylamin oxidiert. Das zweite wichtige Enzym der Ammoniak-Oxidation ist die periplasmatische Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO), die Hydroxylamin (NH_2OH) zu Nitrit (NO_2^-) oxidiert. Die HAO ist ein trimeres Enzym und beinhaltet drei äquivalente Untereinheiten. Biochemisch laufen die beiden Reaktionen wie folgt ab:



Entsprechend der englischen Terminologie verwende ich im Folgenden die Begriffe Ammoniak bezogen auf die Umsetzung durch Mikroorganismen, aber Ammonium bezogen auf die Ausscheidung aus Schwämmen.

Die weitere Oxidation zu Nitrat (NO_3^-) wird von generell obligat lithotropen Nitrit-oxidierenden Bakterien (NOB) katalysiert (Kowalchuk and Stephen 2001, Koops *et al.* 2006, Bock und Wagner 2006). Die membrangebundene Nitrit-Oxidoreduktase (NO_2^- -OR) oxidiert Nitrit mit H_2O als O_2 -Quelle zu Nitrat (Abb. 2-6).

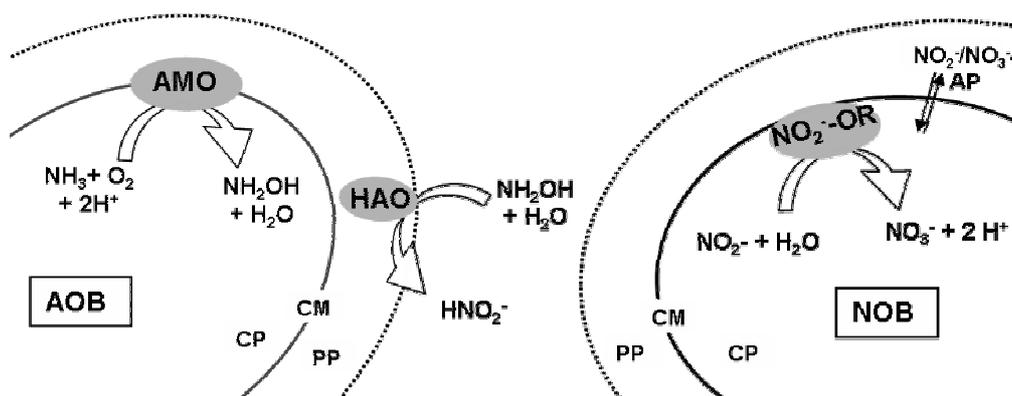


Abbildung 2-6: Vereinfachte schematische Darstellung der Ammoniak-Oxidation durch Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB) und der Nitrit-Oxidation durch Nitrit-oxidierende Bakterien (NOB) nach Bock und Wagner (2006). AMO: Ammoniak-Monooxygenase, HAO: Hydroxylamin-Oxidoreduktase, NO_2^- -OR: Nitrit-Oxidoreduktase, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -AP: Nitrit/ Nitrat-Antiporter, CM: Cytoplasmamembran, CP: Cytoplasma, PP: Periplasma.

2.3.3 Phylogenie und Genetik

Molekulare Analysen haben gezeigt, dass alle bisher bekannten Ammoniak-oxidierenden Bakterien zu den Beta- oder Gammaproteobakterien gehören. Die Gattungen *Nitrosomonas* (inklusive *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobulus* bilden eine eng verwandte monophyletische Gruppe innerhalb der Betaproteobakterien, wobei die drei letztgenannten möglicherweise zu einer Gattung *Nitrosospira* reklassifiziert werden können (Teske *et al.* 1994). Die Nitrosomonaden unterteilen sich weiterhin in die Subcluster *N. europea/ Nc. mobilis*, *N. marina*, *N. oligotropha* und *N. communis* wohingegen *N. cryotolerans* eine separate Abstammungslinie innerhalb der Betaproteobakterien bildet. Mitglieder der Gattung *Nitrosospira* sind klar von der Gattung *Nitrosomonas* getrennt und lassen sich in mindestens 5 Subcluster unterteilen (Koops *et al.* 2006). Die beiden einzigen kultivierten marinen *Nitrosococcus*-Arten (*N. halophilus* und *N. oceani*) sind weitläufig mit Methan-Oxidierern verwandt und fallen im Subphylum der Gammaproteobakterien zusammen. Alle bekannten Nitrit-oxidierenden Bakterien (NOB) gehören zu den Gattungen *Nitrobacter* (Alpha-), *Nitrococcus* (Gamma-), *Nitrospina* (Deltaproteobakterien) oder zum Phylum Nitrospira.

Die Ammoniak-Monooxygenase (AMO) wird von einem Operon aus drei Genen codiert (*amoC*, *amoA* und *amoB*). *AmoA*, welches die aktive Untereinheit der Enzyms darstellt, wird häufig als phylogenetischer Marker zur Identifikation nitrifizierender Bakterien herangezogen (Purkhold *et al.* 2000, 2003, Aakra *et al.* 2001, Norton *et al.* 2002). *AmoC* codiert wahrscheinlich ein Chaperon, das an der Integration von *AmoA* und *AmoB* in die Membran beteiligt ist (Klotz *et al.* 1997). Betaproteobakterien haben in der Regel zwei bis drei komplette AMO-Operons im Genom, wobei fast immer eine zusätzliche Kopie von *amoC* zu finden ist. Gammaproteobakterien besitzen dagegen nur ein AMO-Operon im Genom.

Die Tatsache, dass auch Archaeen unter aeroben Bedingungen Ammoniak zur Energiegewinnung oxidieren können, wurde erst vor wenigen Jahren erkannt (Treusch *et al.* 2005). Der einzige bis dato kultivierte marine Vertreter, *Candidatus Nitrosopumilus maritimus*, zeigte in Kultur eine zellspezifische Ammoniak-Oxidationsrate von etwa 4 fmol pro Tag (Könneke *et al.* 2005). In Anreicherungsversuchen mit Ammoniak-oxidierenden Archaeen aus Meerwasser und einer heißen Quelle, konnten ebenfalls Umsetzungen von Ammoniak zu Nitrit beobachtet werden (Wuchter *et al.* 2006, Hatzenpichler *et al.* 2008). Alle bekannten Archaeen, die ver-

mutlich nitrifizieren können, gehören zum Subphylum der Crenarchaea, wobei die meisten terrestrische Vertreter zur Gruppe I.1B und Vertreter aus marinen Habitaten größtenteils zur Gruppe I.1A gehören (Schleper *et al.* 2005, Nicol und Schleper 2006, Dawson *et al.* 2006).

2.3.4 Hinweise für Nitrifikation in Schwämmen

Schwämme, wie viele marine Invertebraten, scheiden Ammonium als Stoffwechselendprodukt aus (Brusca und Brusca 1990). Zudem stellen sie durch ihre hohe Phagozytoseaktivität eine reichhaltige Stickstoffquelle für potentiellen ‚Symbionten‘ dar. Zu Beginn dieser Promotionsarbeit gab es insgesamt drei Publikationen, die sich mit der Nitrifikation in Schwämmen beschäftigten und im Jahr 2007 kamen weiter drei hinzu, deren Ergebnisse hier zusammengefasst werden sollen. Für viele Schwämme wurde zusätzlich zur Ammoniumausscheidung, die Exkretion von Nitrat oder Nitrit nachgewiesen (Corredor *et al.* 1988, Diaz und Ward 1997, Jiménez und Ribes 2007). Der Nachweis von Nitrat und/ oder Nitrit als Ausscheidungsprodukt von Schwämmen wurde als Hinweis für das Vorhandensein und die Aktivität von nitrifizierenden Bakterien gedeutet (Corredor *et al.* 1988, Diaz und Ward 1997, Jiménez und Ribes 2007). Diese Hypothese deckt sich mit dem molekularen Nachweis von 16S rRNA-Gen-Sequenzen Ammoniak-oxidierender Bakterien wie z. B. *Nitrosomonas*- (Diaz *et al.* 2004) oder *Nitrososoccus*-Spezies (Hentschel *et al.* 2002). Auch Archaeen sind zahlreich in Schwämmen nachgewiesen worden (Preston *et al.* 1996, Lee *et al.* 2003, Holmes und Blanch 2006, Taylor *et al.* 2007). Zusätzlich zu Ammoniak-oxidierenden Bakterien (AOB) und Archaeen (AOA) wurden auch Mikroorganismen nachgewiesen, die nah verwandt sind zu *Nitrospina gracilis* und dem Phylum *Nitrospira* und somit potentielle Nitrit-Oxidierer darstellen (Hentschel *et al.* 2002).

2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, Stoffflüsse im Stickstoff-Kreislauf sowie mögliche Interaktionen zwischen marinen Schwämmen und ihren assoziierten Mikroorganismen aufzuklären und die beteiligten Mikroben zu identifizieren und phylogenetisch zuzuordnen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Physiologie und Phylogenie der mikrobiellen Nitrifikation gelegt. Zunächst sollten Schwamm-Hälterungsexperimente mit dem Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba* durchgeführt werden, um die Ausscheidung und Aufnahme von Ammonium, Nitrit und Nitrat in lebenden Schwämmen zu testen. Ein Teilaspekt bestand in der Messung der Stoffwechselraten zu verschiedenen Jahreszeiten, was im Rahmen von regelmäßigen Freilandarbeiten nach Rovinj (Kroatien) durchgeführt werden sollte. Darüberhinaus sollten eine weitere bakterienhaltige Schwammart (*Chondrosia reniformis*) und zwei natürlich bakterienfreie Schwammarten (*Dysidea avara* und *Tethya* sp.) vergleichsweise mit untersucht werden. Durch die Zugabe verschiedener Nitrifikations- und Denitrifikations-spezifischer Hemmstoffe sollte die prinzipielle Beteiligung von Mikroorganismen an diesen Stoffumsetzungen bewiesen werden. Ein weiteres Ziel war es, durch die Erstellung von 16S rRNA- und *amoA*-Genbanken nitrifizierende Bakterien und Archaeen nachzuweisen und phylogenetisch zuzuordnen. Darüberhinaus wurde angestrebt, die entsprechenden Mikroorganismen kultivierungsunabhängig direkt in Zell-Präparationen von *A. aerophoba* mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zu visualisieren. Abschließend sollte das Schlüsselgen der mikrobiellen Nitrifikation (*amoA*) von Bakterien und Archaeen in einer bestehenden Metagenombank des mikrobiellen Konsortiums des Schwamms *A. aerophoba* identifiziert, sequenziert und analysiert werden. Mit dieser Kombination von physiologischen, phylogenetischen und molekularen Arbeiten, sollte der Prozess der mikrobiellen Nitrifikation im marinen Schwamm *A. aerophoba* und weiteren Mittelmeer-Schwammarten nachgewiesen werden. Mit diesen experimentellen Arbeiten sollte ein Beitrag zum Verständnis der Stoffflüsse zwischen Schwämmen, den ältesten noch rezenten Metazoen, und ihren mikrobiellen Konsortien geliefert werden.

3 Methoden

Alle während dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Enzyme und ‚Kits‘, Oligonukleotide sowie die Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen sind in Kapitel 7 (Anhang) tabellarisch aufgeführt.

3.1 Lebendschwamm-Experimente

3.1.1 Probennahme

Die in dieser Arbeit verwendeten bakterienhaltigen und bakterienfreien Schwammarten sind in den Abbildungen 3-1 und 3-2 aufgeführt. Die Mittelmeerschwämme *Aplysina aerophoba*, *Crambe crambe*, *Tethya* sp., *Dysidea avara* und *Chondrosia reniformis* wurden vor der Küste Rovinj's, Kroatien (45°05'N, 13°38'E) in einer Tiefe von 2-20 m bei Tauch- bzw. Schnorchelgängen in den Jahren 2003-2006 gesammelt. Gewebestücke des Schwammes *A. aerophoba* wurden zusätzlich vor der Küste von Banyuls sur Mer, Frankreich (42°29'N; 03°08'E) im April 2003 gesammelt. Der vor der Küste der Caroline Islands, Palau (07°23'N; 134°38'E) gesammelte pazifische Schwamm *Theonella swinhoi* wurde von Prof. Jörn Piel (Universität Bonn, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Schwamm *Xestospongia muta* wurde bei SCUBA-Tauchgängen vor Little San Salvador Island, Bahamas (24°34.39'N, 75°58.00'W) in Wassertiefen von 10-15 m gesammelt. Die Tiere wurden vom Substrat entfernt und in Plastiktüten oder -behältern ohne Kontakt zur Außenluft an die Wasseroberfläche transportiert. Zur molekularen Bearbeitung wurden Gewebestücke von ca. 1 cm³ Größe in steril filtriertem Meerwasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Meerwasserproben wurden in naher Umgebung zu den Schwämmen in Frankreich und Kroatien im gleichen Zeitraum genommen. Etwa 500 ml wurden filtriert (0.2 µm bottle top filter) und die Filter wurden bei -80°C gelagert. Sedimentproben aus Rovinj wurden bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Mittelmeerschwämme, mit denen Inkubations-Experimente geplant waren, wurden zum Institut ‚Ruđer Bošković‘ in Rovinj gebracht, wo sie in großen Hälterungsbecken konstant mit frischem Meerwasser versorgt wurden.

Bakterienhaltige Schwammarten



Foto: K. Bayer

Art: *Aplysina aerophoba*
 Ordnung: Verongida
 Familie: Aplysinidae



www.naturepicture.net

Art: *Chondrosia reniformis*
 Ordnung: Hadromerida
 Familie: Chondrillidae



www.poppe-images.com/

Art: *Theonella swinhoei*
 Ordnung: Lithistida
 Familie: Theonellidae



Foto: S. Schmitt (Universität Würzburg)

Art: *Xestospongia muta*
 Ordnung: Haplosclerida
 Familie: Callyspongiidae

Abbildung 3-1: In dieser Arbeit verwendete bakterienhaltige Schwammarten.

Bakterienfreie Schwammarten



www.doris.ffessm.fr

Art: *Crambe crambe*
 Ordnung: Poecilosclerida
 Familie: Crambiidae



www.zeeinzicht.nl

Art: *Dysidea avara*
 Ordnung: Dendroceratida
 Familie: Dysideidae



Foto: K. Bayer

Art: *Tethya* sp.
 Ordnung: Hadromerida
 Familie: Tethyidae

Abbildung 3-2: In dieser Arbeit verwendete bakterienfreie Schwammarten.

3.1.2 Experimente mit lebenden Schwämmen

Experimentelles Design

Experimente mit lebenden Schwämmen wurden stets direkt vor Ort in Kroatien am Institut ‚Ruđer Bošković‘ während der Exkursionen im Juni und September 2004, Mai 2005 und April 2006, durchgeführt. Getestet wurden die Arten *Aplysina aerophoba*, *Chondrosia reniformis*, *Tethya* sp. und *Dysidea avara*. Die Sammlung der Schwämme lag beim Start der

Experimente nie länger als 1-2 Tage zurück. Die Schwämme wurden in Versuchsaquarien (5l Gesamtvolumen) in 3l frischem, unbehandeltem Meerwasser gehältert. Um eine stetige Wasserzirkulation zu gewährleisten, wurden kleine Pumpen (VitaKraft, Modell 3000) in den Aquarien verwendet. Für jede untersuchte Schwammart wurden mindestens drei Individuen pro Versuchsansatz getestet. Bei jedem Versuch wurde jeweils eine Kontrolle (Aquarium ohne Schwamm) durchgeführt. Die Versuchsaquarien wurden in einem großen Wasserbecken (>1000l Gesamtvolumen), dem ständig Frischwasser aus dem Mittelmeer zugeführt wurde, platziert, um die Temperatur während der Experimente an die natürlich vorherrschenden Bedingungen des Mittelmeeres anzugleichen (Abb. 3-3). Für die Inkubationsexperimente wurden generell nur Individuen verwendet, die zu Beginn der Versuche in gutem physiologischem Zustand waren, d.h. Pumpaktivität zeigten. Das aktive Pumpen der Schwämme wurde visuell durch Verwendung des Farbstoffs Fluorescein getestet.

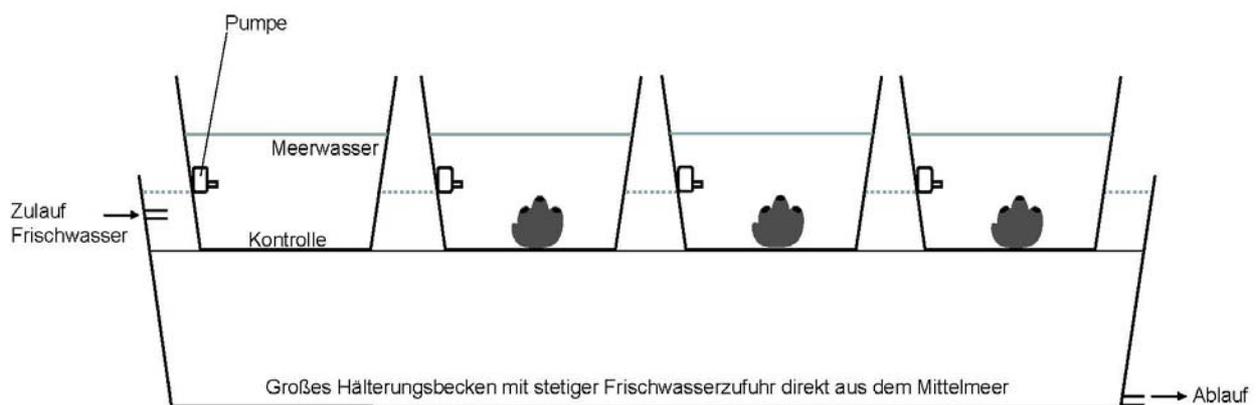


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Inkubationsexperimente mit Schwämmen.

Zur Hemmung der bakteriellen Nitrifikation wurde der spezifische Hemmstoff Nitrapyrin (Sigma) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 mg/l und 50 mg/l) vor Versuchsbeginn zum Inkubationswasser gegeben. Für die Ammoniumaufnahme-Experimente wurden 100 μM bzw. 200 μM NH_4^+ (Endkonzentration) vor dem experimentellen Beginn in das Inkubationswasser gegeben. Zusätzlich sollte in einem Aufnahme-Experiment die mikrobielle Nitrifikation gehemmt werden. Dadurch sollte geprüft werden, in welchem Maße der zusätzliche Ammoniumbedarf durch nitrifizierende Mikroorganismen bedingt ist. Zu diesem Zweck enthielt das Inkubationswasser bei Experimentstart 200 μM Ammonium und 10 mg/l Nitrapyrin (Endkonzentration). Zur Bestimmung der Nitrataufnahme wurde 100 μM

NO_3^- (Endkonzentration) vor Versuchsbeginn zum Inkubationswasser gegeben. Zur Hemmung der bakteriellen Nitrit-Oxidation in *A. aerophoba*, wurde 10 mM Natriumchlorat (NaClO_4) ins Inkubationswasser der Schwämme gegeben. Um mögliche denitrifizierende Prozesse in *A. aerophoba*-Schwämmen zu unterbinden, wurden Schwämme in Natriumazid (NaN_3) inkubiert. Dieser Hemmstoff inhibiert durch seine antimikrobielle Wirkung den Nitratnachweis. Deshalb wurden die zu untersuchenden Schwämme in 24 μM NaN_3 (Endkonzentration) vorinkubiert (1h und ÜN) und anschließend für das eigentliche Experiment in frischem Meerwasser gehältert. Um die Pumpaktivität und die möglicherweise damit verbundene Nitratexkretion während eines laufenden Experiments zu beeinflussen, wurde gelöstes Nikotin (85-100 ng/ ml) zu *A. aerophoba*-Schwämmen gegeben. Die Hemmung der Pumpaktivität bei *A. aerophoba* wurde auch durch mechanischen Verschluss der Ausstromöffnungen (Osculi) mittels Zahnstocher herbeigeführt.

Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts von Schwämmen

Zur Bestimmung des Frischgewichts wurden die getesteten Schwämme nach den Experimenten den Versuchsaquarien entnommen. Überschüssiges Wasser wurde mit leichtem Druck aus den Wasserkanälen gepresst und die Schwämme anschließend gewogen. Für die Korrelation Frischgewicht zu Trockengewicht wurden die Schwämme aus den Experimenten in möglichst unterschiedlich große Fragmente zerteilt, das Frischgewicht bestimmt, die Schwammstücke anschließend bei 60°C für 72h getrocknet und zur Bestimmung des Trockengewichtes gewogen.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von anorganischen Stickstoffverbindungen im Inkubationswasser

Probennahme und Nachweise

In unterschiedlichen Zeitintervallen von 30 min bis hin zu mehreren Stunden (ÜN) wurden jeweils 10 ml Wasserprobe aus jedem Versuchsaquarium entnommen und auf Eis oder bei -20°C gelagert, um weitere bakterielle Stoffwechsellumsetzungen zu vermeiden. In den entnommenen Wasserproben wurden die Konzentrationen der gelösten anorganischen Stickstoffverbindungen Ammonium/ Ammoniak und Nitrit mittels colorimetrischer Standardmethoden nachgewiesen (Parsons *et al.* 1984). Nitrat wurde indirekt nach bakterieller Umsetzung zu Nitrit durch den Nitritreduktase negativen *E. coli*-Stamm *JBC 606* nachgewiesen (Pospesel *et al.* 1998). Parallel zu jeder Messung wurden Standardreihen von 0-

100 μM der jeweiligen Stickstoffverbindungen mitgemessen (NH_4Cl , NaNO_2^- , NaNO_3^-), anhand welcher die Konzentrationen im Inkubationswasser berechnet wurden. Frische Standardlösungen wurden wöchentlich angesetzt.

Ratenberechnung

Die Auswertung der Exkretions- bzw. Aufnahme­raten aller *in vivo* Inkubationsexperimente wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Berechnung der Exkretionsraten erfolgte generell für die ersten 8-9 Stunden. Durch die errechneten Punkte wurde eine Ausgleichsgeraden gelegt. Die Steigung dieser Ausgleichsgeraden entsprach der Rate, mit der die jeweilige Stickstoffverbindung in einem Experiment von einem Schwamm ausgeschieden wurde. Die erhaltenen Exkretionsraten von Schwämmen wurden statistisch mittels des Programms SPSS Version 10 ausgewertet.

3.1.4 Gewinnung mikrobieller Biomasse aus frischem Schwammgewebe

Um Mikroorganismen aus dem Gewebe des Schwammes *Aplysina aerophoba* abzutrennen, wurde zunächst die äußere Schicht (Pinacoderm) mittels eines sterilen Skalpell vorsichtig vom Inneren des Schwammes (Mesohyl) abgetrennt und das Mesohyl in kleine ca. 5mm^3 große Stücke zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in ein 50ml Falcon Röhrchen mit eiskaltem Calcium- und Magnesium- freiem künstlichem Meerwasser (CMFASW) mehrfach gewaschen, in frisches CMFASW überführt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Durch die Abwesenheit von Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen kommt es zu einer Dissoziation eukaryontischer Zellen im Mesohyl. Anschließend wurden die Schwammstücke mit Mörser und Pistill homogenisiert, wieder in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und ca. 5 min stark geschüttelt (Vortexer). Das Homogenisat wurde durch ein Nytex-Sieb filtriert, um grobe Gewebestücke zu entfernen und anschließend durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Vom Filtrat wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt bei $600 \times g$ für 10 min (Heraeus, Megafuge) die Schwammzellen abgetrennt. Zur Isolierung der Bakterien wurde der Überstand wiederum zentrifugiert ($1600 \times g$, 10 min). Die isolierten Bakterien wurden in CMFASW so oft gewaschen, bis der Überstand klar war, um alle Sekundärmetabolite zu entfernen. Danach wurden die Bakterien in CMFASW aufgenommen und für die weitere Verwendung bei -20° mit Glycerin (15% Endkonzentration) eingefroren bzw. für FISH fixiert.

3.2 Molekulare Methoden

3.2.1 Extraktion genomischer DNA

Generell wurde zur DNA-Extraktion das ‚Fast DNA Spin Kit (for soil)‘ der Firma MP Biomedicals (Heidelberg, Deutschland) nach Angabe des Herstellers verwendet. Tiefgefrorene Schwammstücke (-80°C) von ca. 10-15 mm³ Größe wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl Pinacoderm als auch Mesohyl des jeweiligen Schwammes verwendet wurde. Zur Extraktion genomischer DNA, aus der mit *A. aerophoba* assoziierten Mikroflora, wurde ein Aliquot Mikroorganismen (entspricht ca. 10⁸ Zellen) verwendet (Punkt 3.1.4). Zur Isolation von DNA aus Meerwasser wurde ein Filter (Punkt 3.1.1) mit einer sterilen Schere zerkleinert und ein Viertel des Filters für die DNA-Isolation verwendet. DNA aus Sedimentproben wurden direkt mit Hilfe des ‚Fast DNA Spin Kit (for soil)‘ extrahiert. Die DNA mittels eines 0.8%igem Agarose-Gel in 1 x TAE bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidium-bromid (EtBr) gefärbt und das Ergebnis digital dokumentiert (BioRad, Gel Doc 2000). Zusätzlich wurde die DNA mittels einer PCR überprüft, in der die universellen eubakteriellen Primer 27f und 1492r verwendet wurden.

3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde zur gezielten Amplifikation von DNA Fragmenten (z.B. *amoA*, 16S rDNA) verwendet. Als Matrize (‚template‘) wurde entweder aufgereinigte DNA (Punkt 3.2.3) oder intakte Bakterienzellen (Kolonie-PCR) verwendet. Ein 50 µl Standard-Reaktionsansatz enthielt jeweils 1 x *Taq* DNA Polymerase Reaktionspuffer (Qiagen), 2 mM jedes Primers, 0.2 mM dNTPs (Sigma) und 1.25 U *Taq* DNA Polymerase (Qiagen). Für eine Kolonie-PCR von transformierten *E. coli*-Zellen wurde wenig Biomasse einer Einzelkolonie direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Bei großen ‚Kolonie-PCR‘-Ansätzen sowie ‚Screenings‘ der Metagenombank APAE02 wurde der ‚REDTaq ReadyMixTM PCR Reaction Mix‘ der Firma Sigma verwendet. Dieser Reaktionsmix enthält bereits die DNA Polymerase, den Reaktionspuffer sowie die dNTPs und lediglich die jeweils benötigten Primer (in der Regel T7 und SP6) mussten noch zugegeben werden. Die ‚Annealing‘-Temperatur der PCRs richtete sich nach den Schmelztemperaturen der jeweils verwendeten Primer. Die Länge des

Elongationsschritts wurde individuell an die Länge des erwarteten PCR-Produkts angepasst. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer und die Längen der jeweiligen PCR-Produkte sind in Tabelle 7-5 (Kapitel 7, Anhang) aufgeführt. Das Standard-PCR-Protokoll umfasst eine Startdenaturierung: 2-5 min bei 96°C; 30-40 Zyklen bestehend aus: 1. Denaturierung: 96°C für 30s bis 1 min, 2. Primer-Hybridisierung: 45-56°C für 30s, 3. Elongation: 72°C für 25s - 90s; und eine Endelongation: 72°C für 5 min. Die PCR-Produkte wurden generell mittels des ‚QIAquick PCR Purification Kits‘ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Wenn es notwendig erschien, z. B. wenn zusätzlich zum erwarteten PCR-Produkt weitere Banden auf dem Gel zu sehen waren, wurde das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet, um PCR-Produkte direkt aus Agarose-Gelen aufzureinigen.

Um spezifisch 16S rRNA-Genfragmente nitrifizierender Betaproteobakterien zu amplifizieren, wurden die Primer AOB189f und AOB1224r verwendet, die von bestehenden FISH-Sonden (NSO190 und NSO1224) abgeleitet wurden. Zum Nachweis archealer 16S rRNA-Gene wurden die universellen Primer Arch21F und Arch985R verwendet. Genfragmente von Anammox-Bakterien sollten durch die Kombination verschiedener Primer (pla64f, Amx156f, Amx223f, Amx820f, Amx820r, Amx1249r) nachgewiesen werden. Das bakterielle *amoA*-Gen wurde mittels des Primerpaars A189/ amoA2-R amplifiziert. Wenn es nötig war, wurde eine nested PCR durchgeführt, indem die Primer AA1F und AA1R sowie 1 µl der vorherigen PCR (A189/ amoA2-R) als ‚template‘ verwendet wurden. Archaeale *amoA*-Genfragmente wurden unter Nutzung der Primer *amo111f* und *amo634r* vervielfältigt. Zum Nachweis von *nirK*-Genen denitrifizierender Bakterien wurden die Primer nirK1F und nirK5R verwendet.

3.2.3 Klonierung von PCR-Produkten

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation amplifizierter DNA-Fragmente wurde das pGEM-T-easy Vektor System bzw. pGEM-T-Vektor System der Firma Promega nach Angaben des Herstellers benutzt. Da PCR-Produkten, die mit der *Taq* DNA Polymerase amplifiziert werden, ein nicht-codierender Adeninrest am 3'-Ende angefügt wird, konnten diese Fragmente direkt in den im ‚Kit‘ enthaltenen linearisierten Vektor mit ‚T-Überhang‘ ligiert werden.

Herstellung elektrokompetenter E. coli-Zellen

Der Stamm *E. coli* XL1 blue wurde für eine Elektroporation kompetent gemacht. Ein Liter LB-Medium wurde mit 5 ml Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 300rpm bis zu einer $OD_{600} = 0.5-0.7$ geschüttelt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gestellt und anschließend 20 min bei 6000rpm bei 4°C (Heraeus, Megafuge 2R) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit insgesamt 1 l sterilem, eiskaltem H_2O_{dd} gewaschen. Der Waschschrift wurde mit insgesamt 0,5 l sterilem, eiskaltem H_2O_{dd} wiederholt. Nach einem weiteren Waschschrift mit insgesamt 0,5 l eiskaltem 10% Glycerin, wurde das Zellpellet in 10% Glycerin im Verhältnis von 1:1 aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 80 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Elektroporation

Um Ligationsprodukte in die kompetenten *E.coli*-Zellen zu transformieren, wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben und diese in eine eiskalte Elektroporationsküvette (EquiBio, EPC 102) überführt. Durch einen elektrischen Impuls von 2.5 kV (EquiBio, Easyject PRIMA) wurden die Zellen transformiert und sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Nach Überführung in ein neues, steriles 2 ml Gefäß wurde der Transformationsansatz ca. 2 h bei 37°C geschüttelt, bevor er auf Selektionsagar (LB-AIX) ausplattiert wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Biomasse von weißen Klonen wurde direkt in eine Kolonie-PCR eingesetzt und das Insert auf die entsprechend richtige Länge hin überprüft.

Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse

Zur Abschätzung der Diversität von amplifizierten Genen wurde ein Doppel-Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei wurden generell, aufgrund ihrer Kompatibilität, die Enzyme *MspI* und *HaeIII* verwendet. Ein 20 µl RFLP-Ansatz beinhaltete 1 x NEB Restriktionspuffer 2, 10 U jeden Enzyms und 10µl des PCR-Produktes. Nach Inkubation für mindestens 2 Stunden bei 37°C wurden die Proben in einem 3% Agarose-Gel in 1 x TAE elektrophoretisch bei 240 V aufgetrennt, das Gel anschließend in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und das Ergebnis digital dokumentiert (BioRad, Gel Doc 2000).

Plasmid-Mini-Präparation

Weißer Klone wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt, in 3ml LB/Amp - Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichten. Von dieser Kultur wurden 2 ml für 2min bei 13.000rpm (Heraeus, Biofuge pico)

zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 150 µl Plasmid Miniprep Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Plasmid Miniprep Puffer 2 wurden die Proben vorsichtig invertiert. Anschließend wurden 150 µl Plasmid Miniprep Puffer 3 zugegeben und die Proben ca. 15min auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm (Heraeus, Biofuge pico) für 20 min, die Überführung des Überstandes in ein neues, steriles Gefäß (1,5 ml) und eine Wiederholung der Zentrifugation für 15 min. Nach Überführung des Überstandes in ein neues steriles Gefäß (1,5 ml) wurde die DNA durch Zugabe von 350 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 13.000rpm (Heraeus, Biofuge pico) für 15 min pelletiert. Die DNA wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut bei 13.000rpm für 5 min zentrifugiert (Heraeus, Biofuge pico) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und die DNA anschließend in 50 µl sterilem H₂O_{dd} aufgenommen.

Sequenzierung

Ein 10 µl Sequenzier-PCR-Ansatz enthielt folgende Reagenzien: 2 µl Premix, 2 µl 5x Sequenzierpuffer (ABI PrismTM Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), 1-2 µl Plasmid-DNA und 25 pmol eines Primers (T7 oder SP6). Die PCR wurde wie folgt durchgeführt; einer Denaturierung für 2 min bei 96°C folgten 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 96°C für 30s, Hybridisierung des Primers bei 45°C für 30s und einer Elongationsphase bei 60°C für 4 min. Für eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten wurde die Annealingtemperatur der Sequenzier-PCR an die der jeweils spezifischen PCR angeglichen. Die Reaktionen wurden gegebenenfalls mittels Ethanol-fällung (100% EtOH) aufgereinigt, gewaschen (70% EtOH) und in 25 µl HiDi-Formamid aufgenommen. Die Analyse der Sequenzen erfolgte an einem Perkin Elmer ABI 377 XL Sequenzierer im Institut für Immunologie und Virologie der Universität Würzburg. Die Rohsequenzen wurden mittels ‚Contig Express‘ des Programmpakets Vector NTI AdvanceTM 10 (Invitrogen) analysiert und gegebenenfalls nachbearbeitet. Die Sequenzen wurden mittels des Basic Local Alignment Search Tools (BLASTn, BLASTx, BLASTp) der Online-Datenbank (GenBank) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) analysiert (Altschul *et al.* 1997).

3.2.4 ,Screening' der Metagenombank APAE02

Beschreibung der Metagenombank APAE02

Die Metagenombank APAE02 wurde von Dr. Lars Fieseler im Rahmen seiner Dissertation am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg erstellt (Fieseler L. 2005). Hochmolekulare DNA des mikrobiellen Konsortiums aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* wurde durch präparative Pulsfeld-Gelelektrophorese isoliert und in Fosmidvektoren (pEpiFos5, Epicenter) ligiert. *E. coli Epi100TM*-Zellen wurden mit dem in Lambda Phagen verpackten Ligationsansatz transduziert und die Klone in 384-,well' Platten (,pools') (LB-Medium, 12,5 µg/ ml Chloramphenicol, 7,5% Glycerin) abgelegt und bei -80°C gelagert. Insgesamt wurden so ca. 29.300 Klone mit rund 1.1 Gb genomischer DNA archiviert.

Präparation rekombinanter Fosmide aus ,pools'

Um die gesamte Metagenombank APAE02 auf das Vorhandensein bestimmter Genen hin zu untersuchen, wurden die Fosmide von allen 384 Klonen eines jeden ,pools' isoliert. Die Klone wurden jeweils mittels eines ,384 pin replicators' (Nunc) auf Agarplatten (LB-Medium, 12,5 µg/ ml Chloramphenicol) transferiert und bis zur Bildung ausreichender Biomasse bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden von der Platte mit Hilfe eines Drigalskispatels und 10 ml TE abgeschwämmt, zentrifugiert und die Fosmide mit dem ,QIAprep Miniprep Kit' (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben für die Aufreinigung von ,low copy' Cosmiden gereinigt. Alternativ wurde das ,EasyPrep Pro-Kit' der Firma Biozym nach Herstellerangaben verwendet. Die Fosmid-DNA des gesamten ,pools' einer Platte wurde anschließend mittels PCR untersucht. Um Fosmide aus einzelnen Klonen zu isolieren, wurde wie oben für Gesamt-,pools' beschrieben, verfahren.

Identifizierung einzelner Klone

Der Nachweis die 16S rDNA- oder *amoA*-Gene tragenden Metagenomklonen erfolgte mittels PCR. Zunächst wurde eine PCR mit den jeweils spezifischen Primern unter Verwendung des ,REDTaq ReadyMixTM PCR Reaction Mix' (Sigma) durchgeführt, in denen sämtliche Fosmide eines ,pools', bestehend aus 384 Einzelklonen, als Matrize dienten. Von den auf diese Weise positiv identifizierten ,pools', wurden sogenannte ,sub-pools' erstellt. Dazu wurden jeweils vier Reihen der 384 Klone eines 'pools' einer über Nacht inkubierten Agarplatte abgeschabt, in 200 µl H₂O_{dd} resuspendiert und für 30 min bei 100°C aufgeköcht.

Nach kurzer Abkühlung und anschließender Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Biofuge pico) bei 13000rpm für 2 min, diente 1 µl des Überstandes als Matrize für eine weitere PCR. Ebenso wurde mit einer zweiten Agarplatte des gleichen ‚pools‘ verfahren, allerdings wurden jeweils vier Spalten abgeschabt und als PCR-Matrize verwendet. Die verbleibenden 16 Einzelklone wurden mittels Kolonie-PCR getestet. Die Ergebnisse dieser ‚screenings‘ wurden durch eine direkte Sequenzierung der jeweiligen PCR-Fragmente verifiziert.

Sequenzierung von Fosmidklonen

Die Sequenzierungen der in dieser Arbeit identifizierten Metagenomklone 4L5, 8N3 (*Nitrospira-amoA*) und 58F6 (*Crenarchaea-amoA*) inklusive Lückenschluss wurde von der Firma Macrogen in Seoul, Korea durchgeführt (<http://www.macrogen.com>). Die Annotation der Metagenomklone erfolgte unter Anwendung des Programmpakets Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen) zur Identifizierung der Protein- codierenden Regionen (‚open reading frames‘-ORFs). Sequenzhomologien zu Datenbankeinträgen (GenBank) wurden mittels ‚BLASTn‘, ‚BLASTx‘ und ‚BLASTp‘ identifiziert (Altschul *et al.* 1997).

3.2.5 Southern-Blot-Analyse

Die Fosmid- und die Gesamt-DNA zweier ausgewählter Einzelkolonien des Metagenomklons 8N3 wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*H1 und *Not*I (jeweils 2 U Endkonzentration) über Nacht bei 37°C verdaut, auf ein 0,8 % iges TPE Agarose-Gel aufgetragen und bei 100 V 6h aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend in EtBr gefärbt und das Ergebnis digital festgehalten. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst 15 min in 0,25 M HCl-Lösung geschwenkt, danach 15 min in Denaturierungslösung und abschließend 15 min in Neutralisationslösung. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die Übertragung der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran.

Kapillarblot auf eine Nylonmembran

In eine Plastikwanne wurde der Transferpuffer (ca. 500 ml 20 x SSC) gegeben und über die Wanne eine Glasplatte gelegt. Ein langer Streifen Whatmanpapier wurde so über die Glasplatte platziert, dass die Enden jeweils in die Transferpuffer tauchten und sich vollsaugten. Das Agarosegel wurde anschließend auf das Papier gelegt und darüber möglichst luftblasenfrei eine in Gelgröße zugeschnittene, mit H₂O angefeuchtete Nylonmembran. Es

folgten drei trockene Stücke Whatmanpapier in Gelgröße sowie mind. 15 cm Zellstoff. Zum Abschluss wurde eine zweite Glasplatte auf den Stapel gelegt und der ganze Aufbau mit ca. 1 kg Gewicht beschwert. Durch die entstehenden Kapillarkräfte wurde die DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran transferiert. Als Positivkontrolle wurde ein *Nitrosospira-amoA*-tragendes Plasmid auf die Membran getropft, die abschließend durch UV-Licht fixiert wurde (UV-Crosslinker, BioRad).

Nicht-radioaktive Sondenmarkierung

Für die Markierung der Sonde wurde das ECL-System von Amersham (Enhanced Chemiluminescence Labelling and Detection System) verwendet. Zur Sondenherstellung wurden 200-400 ng eines PCR-Produkts (*amoA*) verwendet (in 20 µl H₂O), das für 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis stabilisiert wurde. Dann wurden 10 µl Labeling Reagenz zugegeben, gemischt und mit 10 µl Glutaraldehyd versetzt. Die Sonde wurde 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Hybridisierung, Waschen und Entwicklung

Zur Vorhybridisierung der Membran wurde diese kurz in 5 × SSC geschwenkt und dann mit 20 ml Hybridisierungspuffer (ECL Gold Hybridisierungspuffer, Amersham) in einem Hybridisierungsröhrchen (Biometra, 15 x 3,5 cm) für 2 h bei 42 °C im Hybridisierungssofen (Memmert, BE 200) inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Nach der Vorhybridisierung wurde die markierte Sonde zugegeben und über Nacht hybridisiert. Die Membran wurde zweimal für 10 min bei 55°C mit Waschpuffer I gewaschen. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer II gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung wurde die Membran mit der Detektionslösung (Amersham) überschichtet und anschließend das Ergebnis mit Hilfe eines Imagers (Intas) dokumentiert.

3.2.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Fixierung

Vom Schwamm durch Zentrifugation abgetrennte Mikroorganismen wurden in 3,7% Formaldehyd oder 4% Paraformaldehyd in 1 x PBS für mindestens 1h bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden danach mehrfach mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in eine 1:1

Mischung aus 100% Ethanol und 1 x PBS aufgenommen, in der sie für mehrere Wochen bei -20°C aufbewahrt werden konnten.

Hybridisierung

Auf jedes Feld eines 8-Feld- Objektträgers wurden 5 µl fixierte Zellen gegeben und bei 37°C auf dem Heizblock fixiert (Laboratory Devices, Digi-Block Jr.). Anschließend wurden die Objektträger 3 min in 50% EtOH, 5 min in 70% EtOH und 3 min in 100% EtOH entwässert und luftgetrocknet. Für grün markierte Sonden (6-FAM) wurden Konzentrationen von 10-15 ng/ µl, für rot markierte Sonden (Cy3) Konzentrationen von 2-5 ng/ µl im Hybridisierungspuffer gewählt. 35 µl des Hybridisierungsmixes wurden pro Feld auf die Objektträger gegeben. Die Hybridisierung (Hybridisierungsofen Memmert, BE 200) erfolgte bei 46°C für 2-3 Stunden in einer feuchten Kammer. Als feuchte Kammer diente dabei eine große Petrischale, die mit Wasser befeuchteten Zellstoff enthielt. 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde auf jedes Feld 1 µl Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, Sigma, 500 ng/ µl Stocklösung) gegeben. Anschließend wurde der Hybridisierungsmix abgezogen und die Objektträger in frisch angesetztem, vorgewärmtem Waschpuffer 30 min bei 48°C gewaschen. Der Waschschrift wurde, wenn nötig, mit frischem Puffer wiederholt. Die Objektträger wurden vorsichtig mit eiskaltem H₂O_d gespült, im Dunkeln luftgetrocknet und mit Citifluor eingedeckt. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Auswertung am Mikroskop

Die Auswertung der Hybridisierungsexperimente erfolgte entweder am Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) oder am Confokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, Zeiss) unter Nutzung der Zeiss Filtersets 10 und 15. Am Epifluoreszenzmikroskop abgespeicherte Bilder (Kamera: Intas, MP Focus 5000) wurden mit der Software Adobe Photoshop CS oder Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet. Am CLSM gespeicherte Bildern wurden mit der Software LSM Image Browser (Zeiss) bearbeitet.

3.3 Phylogenetische Stammbaum-Berechnungen

3.3.1 Sequenz-Alignments

Die 16S rDNA-Sequenzen aus Schwämmen, Meerwasser und Sedimentproben wurden mit den Programmen ‚Pintail‘ (Ashelford *et al.*, 2005) und ‚Chimera Check‘ auf Chimären hin untersucht. Sowohl 16S rDNA-Nukleotidsequenzen also auch *amoA*-Aminosäuresequenzen wurden zusammen mit jeweils verwandten Referenzsequenzen, die über die Sequenzdatenbank NCBI identifiziert wurden, aligniert. Computergenerierte Alignments wurde unter Verwendung des Programms ‚ClustalX‘ erstellt, die in dem Windows-basiertem Sequenz-Alignment-Editor ‚Align‘ (Hepperle 2002) manuell überprüft und korrigiert wurden. Alle aus dieser Arbeit resultierenden Sequenzen wurden in der NCBI Datenbank (‚GeneBank‘) unter folgenden ‚Accession‘-Nummern abgelegt; *Nitrosospira*-16S rDNA: EF529668-EF529695, *Nitrosospira*-*amoA*-Sequenzen: EF529629-EF529649, archaeale 16S rDNA: EF529650-EF529656, archaeale *amoA*-Sequenzen: EF529657-EF529666. Die Sequenzen der Metagenomklone 4L5, 8N3 und 58F6 wurden noch nicht übermittelt.

3.3.2 Phylogenetische Auswertung

Für die phylogenetischen Stammbaum-Berechnungen der 16S rRNA-Gene wurde von den alignierten Sequenzen mittels des Programms ‚Phylip‘ und des ‚ARB‘-Programm-Pakets Distanzmatrixen und ‚Parsimony‘-Analysen erstellt (Ludwig *et al.*, 2004). Jeweils 100 Berechnungen resultierten in einem ‚Konsensus-Baum‘ welcher mittels des Programms ‚Treeview‘ dargestellt wurde. Für die Berechnung von Verwandtschaftsverhältnissen der erhaltenen *amoA*-Aminosäuresequenzen wurde das Programm MrBayes verwendet. Sowohl für archaeale als auch für bakterielle Sequenzen wurden jeweils 3.000.000 Generationen berechnet. Der resultierende Konsensus-Baum wurde ebenfalls mittels ‚Treeview‘ dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Experimente mit lebenden Schwämmen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente mit lebenden Schwämmen wurden während vier Expeditionen im Zeitraum zwischen Juni 2004 bis April 2006 zu unterschiedlichen Jahreszeiten im Institut ‚Ruđer Bošković‘ in Rovinj/ Kroatien durchgeführt. Direkt nach der Sammlung der Schwämme wurden diese in ein großes Hälterungsbecken gebracht, dem stetig frisches Mittelmeerwasser zugeführt wurde. Die jeweiligen Inkubationsexperimente wurden immer innerhalb von zwei Tagen nach der Sammlung der Schwämme gestartet.

4.1.1 Jahreszeitliche Temperaturschwankungen im Mittelmeer

Um einen Einfluss der Temperaturen auf den Schwammstoffwechsel abzuschätzen, wurden die tagsüber vorherrschenden Wassertemperaturen aufgezeichnet (Abb. 4-1). Im April variierten die Wassertemperaturen zwischen 12-14 °C. Im Mai lagen die Temperaturen bei 15-18 °C, wohingegen im Juni das Wasser mit 22-25 °C deutlich wärmer war. Die höchsten Temperaturen wurden während der Expedition im August gemessen (25-29 °C). Die letzteren Werte stammen aus einer vorangegangenen Expedition (2003) und sollen die Darstellung der Wassertemperaturen vervollständigen. Im September waren die Wassertemperaturen mit 22-25 °C wieder etwas niedriger.

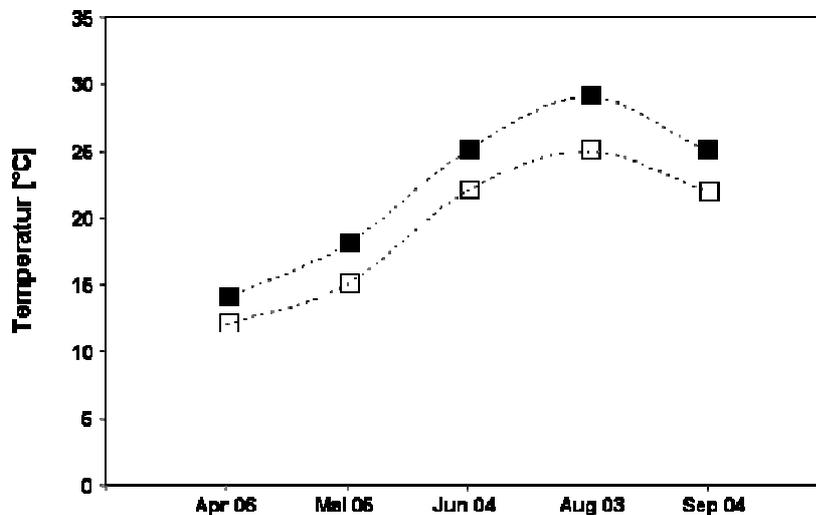


Abbildung 4-1: Minimal- (□) und maximal- (■) vorherrschende Tages-Wassertemperaturen in Rovinj / Kroatien während der Experimente.

4.1.2 Bestimmung der Frischgewicht- /Trockengewicht-Korrelation

Generell wurde bei der Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts darauf geachtet, dass keine Einschlüsse wie beispielsweise kleine Steine oder Substrat im oder am Schwammgewebe verblieben, da diese die Ergebnisse offensichtlich verfälscht hätten. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie der Korrelationen von Frisch- zu Trockengewicht für die verwendeten Schwämme ist in Tabelle 4-1 wiedergegeben. Das Bestimmtheitsmaß gibt den linearen Zusammenhang zwischen Frisch- und Trockengewicht an, wobei 1 einen exakten und 0 keinen linearen Zusammenhang bedeutet.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Korrelation von Frisch- (x) zu Trockengewicht (y). n: Anzahl der Schwammstücke, r²: Bestimmtheitsmaß.

Art	Anzahl (n)	Korrelation	Bestimmtheitsmaß
<i>Aplysina aerophoba</i>	150	$y = 0,1867x$	$r^2 = 0,8965$
<i>Chondrosia reniformis</i>	16	$y = 0,2012x$	$r^2 = 0,97$
<i>Tethya</i> sp.	18	$y = 0,3338x$	$r^2 = 0,9703$
<i>Dysidea avara</i>	15	$y = 0,8741x$	$r^2 = 0,8055$

4.1.3 Ammonium- und Nitrat Ausscheidung in *Aplysina aerophoba*

Die Exkretion von gelöstem anorganischem Stickstoff [Ammonium (NH₄⁺), Nitrat (NO₃⁻), Nitrit (NO₂⁻)] wurde mit jeweils drei frisch gesammelten Individuen getestet. Die natürlich vorkommenden Konzentrationen an NH₄⁺ (0-2 µmol) und NO₃⁻ (0-3 µmol) waren in allen Kontrollexperimenten konstant und werden daher in den folgenden Abbildungen nicht weiter dargestellt. In keinem der durchgeführten Inkubationsexperimente wurde NO₂⁻ nachgewiesen. Die Exkretionsraten wurden generell über die ersten 8-9 Stunden der Experimente berechnet, um die in diesem Zeitraum nahezu linearen Raten bestmöglich miteinander vergleichen zu können. In den Inkubationsexperimenten mit *A. aerophoba*-Schwämmen während der verschiedenen Jahreszeiten zeigten die NH₄⁺- und NO₃⁻-Exkretionsraten eine deutliche saisonale Variabilität. Im April war die NO₃⁻-Exkretion am höchsten, wohingegen NH₄⁺ nicht im Inkubationswasser nachgewiesen wurde (Abb. 4-2 A). Im Mai war die NO₃⁻-

Exkretionsrate in *A. aerophoba* im Vergleich zu der hohen Rate im April etwa um die Hälfte reduziert und etwa gleich der NH_4^+ -Exkretionsrate (Abb. 4-2 B). Im Juni zeigten die getesteten Schwämme eine NH_4^+ -Ausscheidung, die deutlich über der von NO_3^- lag (Abb. 4-2 C). Im August schieden *Aplysina*-Schwämme etwas mehr NH_4^+ , dagegen nur geringfügig weniger NO_3^- als im Juni aus (Abb. 4-2 D). Die höchste NH_4^+ -Exkretionsrate wurde im September gemessen und war mehr als doppelt so hoch wie im August. Die Ausscheidung von NO_3^- im September hingegen war die niedrigste die je bei *A. aerophoba* gemessen wurde (Abb. 4-2 E). Eine Zusammenfassung der jeweiligen Raten ist in Tabelle 4-2 wiedergegeben.

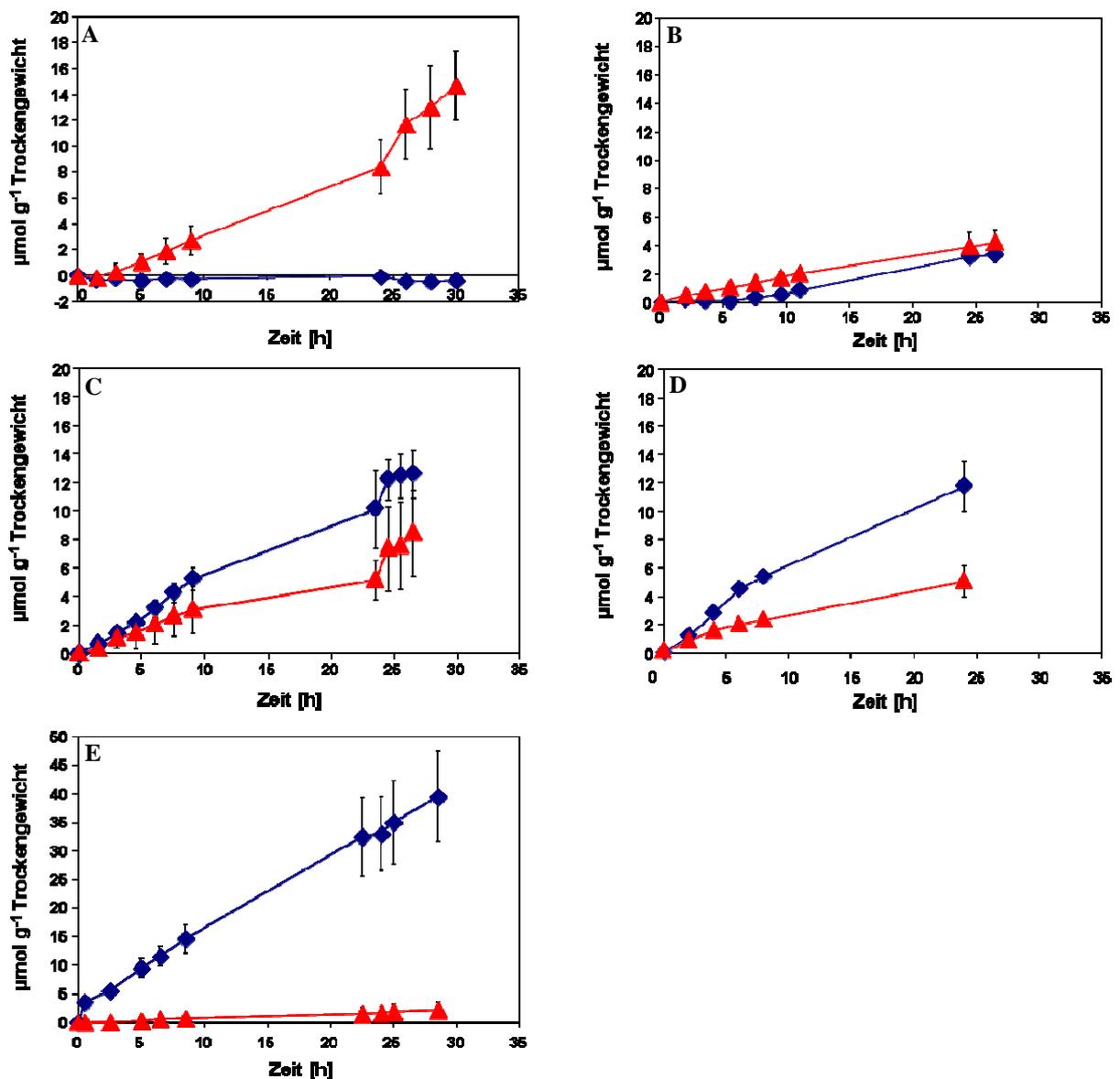


Abbildung 4-2: Ammonium- (♦) und Nitrat- (▲) Ausscheidung von *A. aerophoba* im April (A), Mai (B), Juni (C), August (D) und September (E) (jeweils $n=3 \pm \text{SEM}$). Man beachte die größere Skaleneinteilung in Abb. 4-2 E.

4.1.4 Einfluss der Hälterungsdauer

Um zu testen, ob die Dauer der Hälterung von *A. aerophoba* Einfluss auf die Exkretion von Stickstoffverbindungen hat, wurden drei Schwämme jeweils 20 Stunden, sechs Tage und 11 Tage nach der Sammlung getestet. Zwischen den Experimenten wurden die Schwämme jeweils in dem großen Hälterungsbecken mit stetiger Frischwasserzufuhr gehältert. Im ersten Experiment (20 h nach Sammlung) zeigten die Schwämme in den ersten sechs Stunden keine Ausscheidung von NH_4^+ . Im weiteren Verlauf war die NH_4^+ -Exkretion ähnlich der von NO_3^- (Abb. 4-3 A). In den Experimenten 6 Tage und 11 Tage nach der Probensammlung waren sowohl die NH_4^+ - als auch NO_3^- -Ausscheidung nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich mit dem ersten Experiment (Wilcoxon-Test: $p > 0,1$). Jedoch war die individuelle Variabilität, vor allem die NO_3^- -Ausscheidung betreffend, extrem hoch (Abb. 4-3 B und C). Deshalb wurden alle folgenden Experimente maximal 1-2 Tage nach Sammlung der Schwämme durchgeführt. Die Exkretionsraten sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

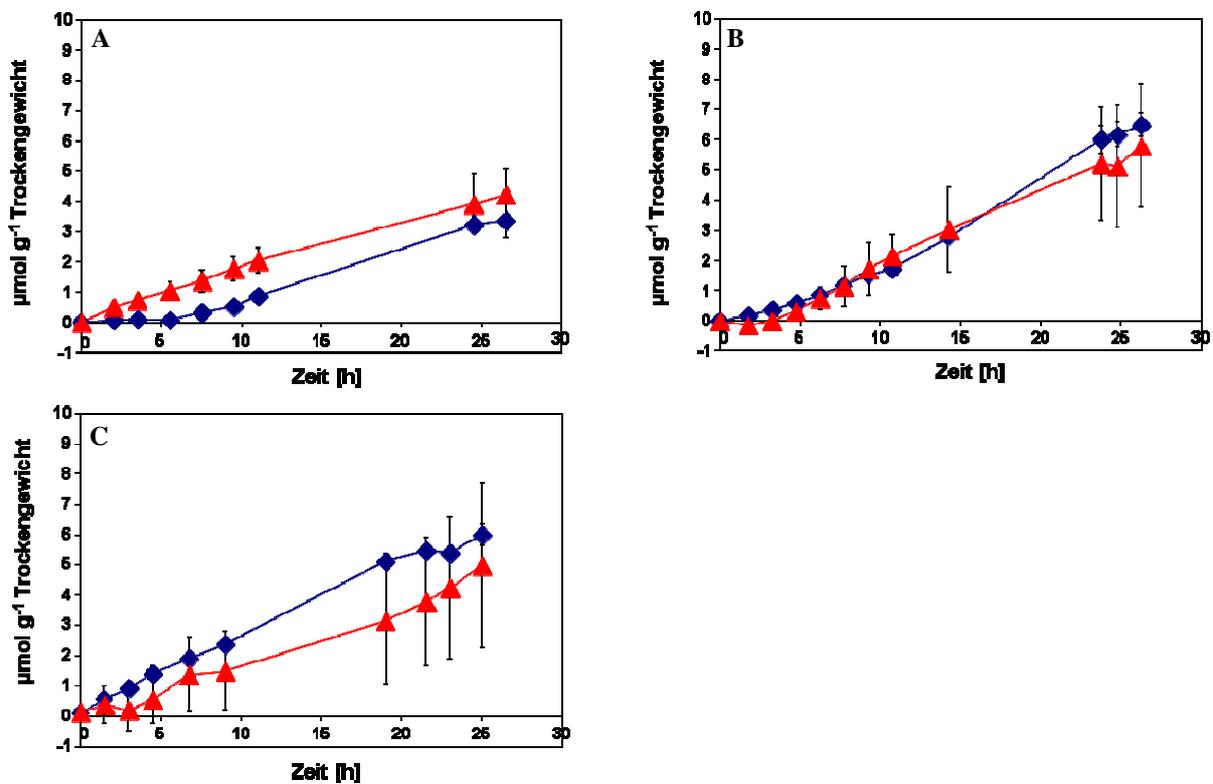


Abbildung 4-3: Ammonium- (◆) und Nitrat-(▲) Ausscheidung von *A. aerophoba* 20 Stunden (A), 6 Tage (B) und 11 Tage (C) nach Sammlung ($n=3 \pm \text{SEM}$).

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der saisonal abhängigen NH_4^+ - und NO_3^- - Ausscheidungsraten [$\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$] in *A. aerophoba* bei normaler Inkubation. # Rate über den gesamten Experimentzeitraum, da die NH_4^+ -Exkretion in den ersten Stunden kaum nachweisbar war. Sowohl die Ammonium- wie auch die Nitratexkretionsraten im Versuch über mehrere Tage (Mai) waren nicht signifikant unterschiedlich (Wilcoxon-Test: $p > 0,1$).

Saison	NH_4^+ -Ausscheidung	NO_3^- - Ausscheidung
April	-12 ± 3	326 ± 117
Mai	55 ± 10	180 ± 46
	$140 \pm 16^{\#}$	$154 \pm 36^{\#}$
	161 ± 17	197 ± 97
6 d	161 ± 17	197 ± 97
11 d	254 ± 97	166 ± 125
Juni	574 ± 87	344 ± 189
August	706 ± 65	291 ± 40
September	1571 ± 235	89 ± 52

4.1.5 Hemmung der Nitratausscheidung

Um zu zeigen, dass die NO_3^- -Ausscheidung der Schwämme das Ergebnis nitrifizierender Mikroorganismen ist, sollte diese durch Zugabe des spezifischen Hemmstoffs Nitrapyrin verhindert werden. Die Durchführung des Experiments fand im April statt, da zu diesem Zeitpunkt die Kontrollschwämme eine deutliche NO_3^- -Ausscheidung zeigten (Abb. 4-4 A). Nitrapyrin wurde in einer Endkonzentration von 10 mg/ l getestet und direkt zum Start des Experiments in das Inkubationswasser gegeben. Die Zugabe von Nitrapyrin inhibierte die NO_3^- -Ausscheidung vollständig, allerdings war ein leichter Anstieg der NH_4^+ -Konzentration messbar (Abb. 4-4 B). Nach einer 4,5-tägigen Erholungsphase in frischem Meerwasser war die NO_3^- -Exkretion wieder ähnlich wie bei den Kontrollschwämmen nach Inkubation ohne Hemmstoff. Ammonium konnte kaum nachgewiesen werden (Abb. 4-4 C). Eine Aufstellung der Raten zu diesem Experiment befindet sich in Tabelle 4-3.

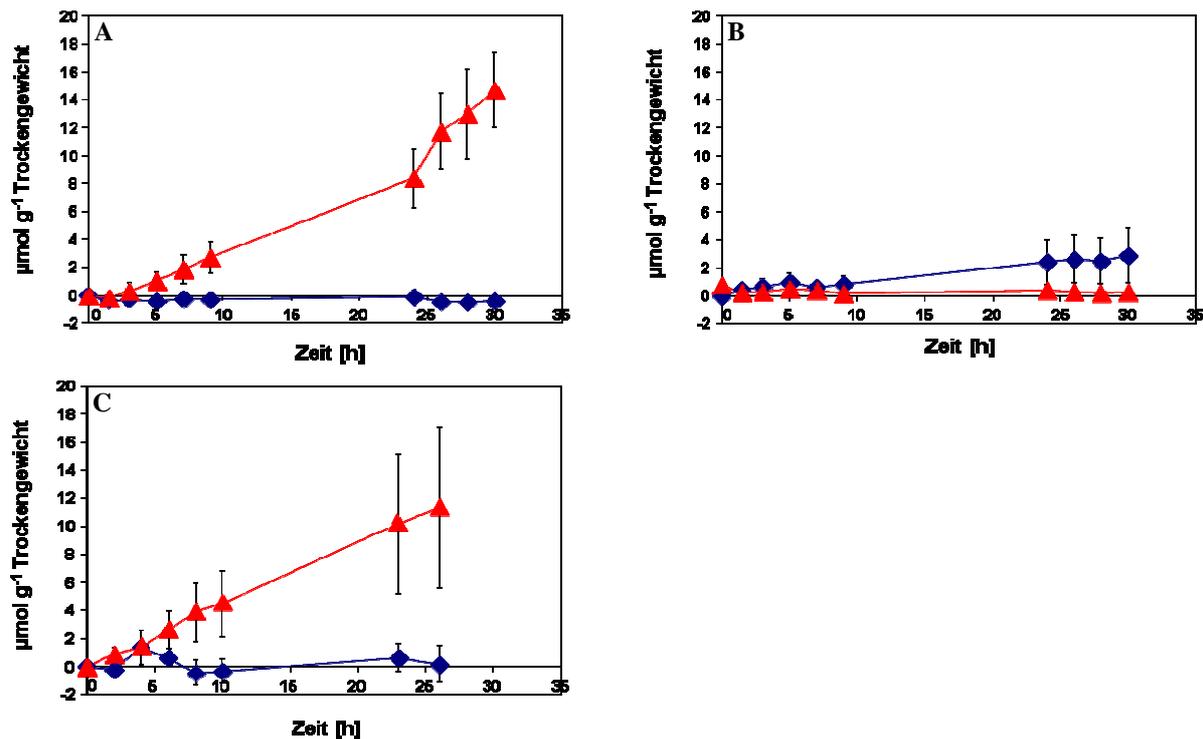


Abbildung 4-4: Ammonium- (♦) und Nitrat- (▲) Ausscheidung in *A. aerophoba* (jeweils $n=3 \pm \text{SEM}$) ohne Hemmstoff (A) und mit 10 mg/l Nitrapyrin (B), sowie erneute Inkubation mit den Schwämmen aus dem Hemmversuch nach viereinhalb Tagen Hälterung in frischem Meerwasser (C).

4.1.6 Hemmung der Pumpaktivität

In vorangegangenen Studien konnte ich zeigen, dass nichtpumpende Schwämme im Vergleich zu pumpenden kein Nitrat, hingegen aber etwa doppelt soviel Ammonium ausscheiden (Bayer 2004). Es lag die Vermutung nahe, dass der aerobe Prozess der Nitrifikation vom Sauerstoffgehalt im Schwammesohyl abhängig ist. Daher wurde versucht, die Pumpaktivität von *A. aerophoba*-Schwämmen während eines laufenden Experiments zu stoppen. Im Juni wurde nach fünf Stunden Nikotinlösung (85 ng/ml Endkonzentration in H_2O) zu aktiv pumpenden Schwämmen gegeben (Abb. 4-5, Pfeil 1). Nach ca. fünf Minuten wurden zusätzlich die Aquariumpumpen ausgeschaltet. Erst nach zwei Stunden zeigten zwei von drei Schwämmen einen verringerten Wasserstrom und die Oscula waren teilweise geschlossen. Eine vollständige Inhibition der Pumpaktivität wurde auch nach einer weiteren Zugabe von Nikotinlösung (100 ng/ml Endkonzentration) nicht beobachtet (Abb. 4-5, Pfeil 2). Während des gesamten Experiments war mindestens ein Osculum pro getestetem Schwamm geöffnet, welches wenn auch in geringerem Ausmaß auch Pumpaktivität zeigte. Die Ausscheidung von NH_4^+ war nach der Zugabe von Nikotin um fast die Hälfte reduziert. Ein weiterer Anstieg der

NO_3^- -Konzentration nach Nikotinzugabe wurde nicht festgestellt (Abb. 4-5). Die Exkretionsraten sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

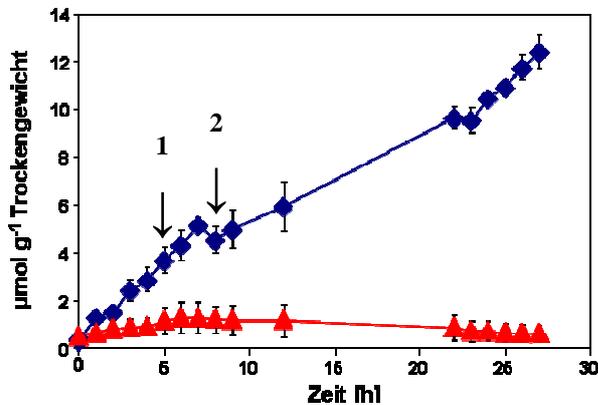


Abbildung 4-5: Ammonium- (♦) und Nitrat- (▲) Ausscheidung in *A. aerophoba* ($n=3 \pm \text{SEM}$). Fünf Stunden nach Versuchsbeginn wurde Nikotin (85 ng/ ml Endkonzentration) ins Inkubationswasser gegeben (Pfeil 1). Pfeil 2 markiert die zweite Nikotinzugabe (100 ng/ ml Endkonzentration).

Die interessante Beobachtung, dass nichtpumpende Schwämme kein NO_3^- ausscheiden, sollte in einem weiteren Experiment bestätigt werden, in dem Schwämme verwendet wurden, deren Oscula von Anfang an geschlossen waren und keine Pumpaktivität zeigten. Kurz nach dem Start des Experiments öffneten diese Schwämme jedoch die Oscula und begannen zu pumpen, sodass ein mechanischer Verschluss der Oscula durch Zahnstocher nötig war, um den Wasserstrom zu unterbinden (Abb. 4-6 A).

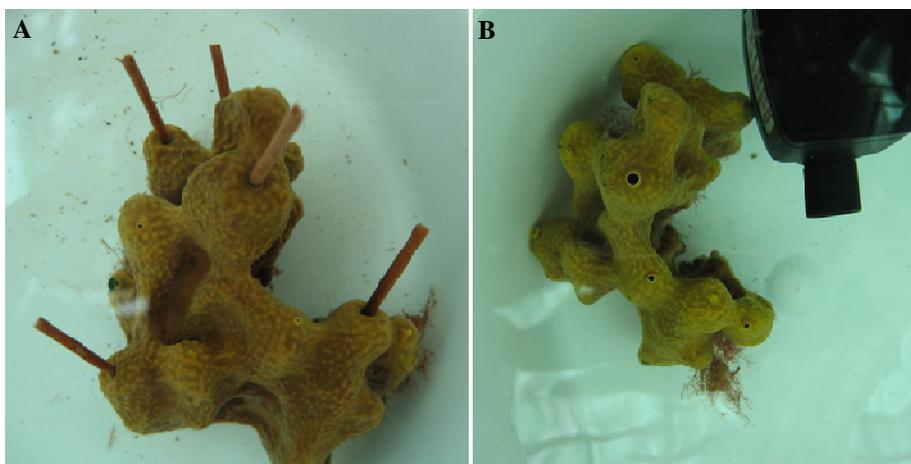


Abbildung 4-6: *A. aerophoba*-Schwamm mit mechanisch verschlossenen Oscula (nicht pumpend, A) und in pumpenden Zustand nach Entfernen der Zahnstocher (B).

Nach sieben Stunden wurden die Zahnstocher aus den Oscula der Schwämme entfernt und die Pumpen in den experimentellen Versuchsaquarien angeschaltet. Die folgende Phase des aktiven Schwammumpens erfolgte über Nacht für ca. 20 Stunden. Danach wurden die Pumpen wieder ausgestellt und die Oscula erneut verschlossen. Das Verschließen der Oscula schien keine größeren Verletzungen am Schwammgewebe zu hinterlassen (Abb. 4-6 B). NH_4^+ wurde während des ganzen Experiments in deutlich messbaren Raten ausgeschieden (Abb. 4-7 A). In der ersten Phase des Experiments wurde keine NO_3^- -Exkretion in den nichtpumpenden Schwämmen gemessen (Abb. 4-7 B, Phase I). Nachdem die Zahnstocher aus den Oscula entfernt wurden, nahmen die Schwämme ihre Pumpaktivität rasch wieder auf und schieden NO_3^- aus (Abb. 4-7 B, Phase II). In der dritten Phase des Experiments, in der das Pumpen der Schwämme wiederum verhindert wurde, verringerte sich die Nitratkonzentration in den Versuchsaquarien stark (Abb. 4-7 B, Phase III). Da dieser Versuch mit nur zwei Individuen durchgeführt wurde, war eine statistische Auswertung nicht möglich. Die Ausscheidungsraten der beiden Schwämme sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

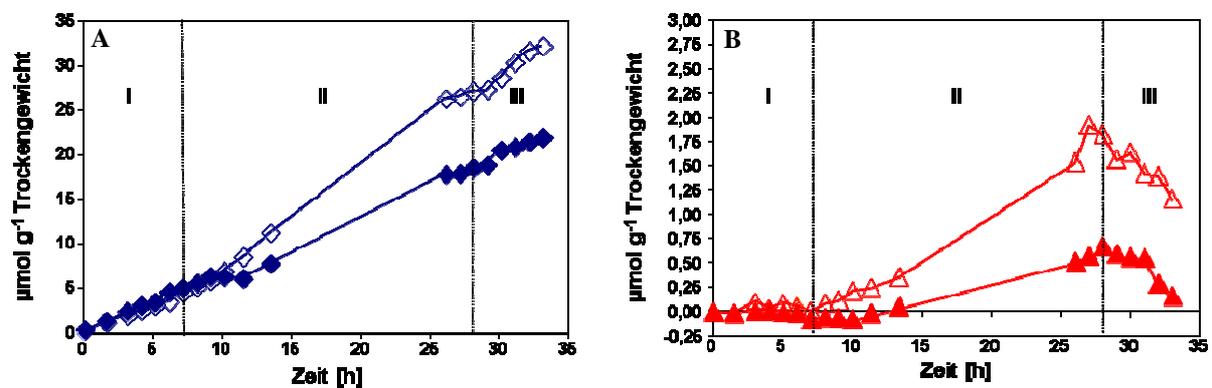


Abbildung 4-7: Ammonium- (A, n = 2, \blacklozenge) und Nitrat- (B, n = 2, \blacktriangle) Ausscheidung in nichtpumpendem (Phase I), in pumpendem (Phase II) und in nichtpumpenden Zustand (Phase III).

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der NH_4^+ - und NO_3^- -Ausscheidungsraten [$\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$] in *A. aerophoba* bei Behandlung mit Nitrapyrin, Nikotin bzw. mechanischem Verschluss der Oscula. S1: Schwamm 1, S2: Schwamm 2.

Behandlung		NH_4^+ -Ausscheidung	NO_3^- -Ausscheidung
Nitrapyrin	Kontrolle	-12 ± 3	326 ± 117
	Hemmung	73 ± 46	-37 ± 14
	Erholung	-3 ± 65	470 ± 250
Nikotin	vor	636 ± 105	111 ± 95
	nach	363 ± 42	-32 ± 16
Zahnstocher		S1 S2	S1 S2
	Phase I	586 ; 703	6 ; -6
	Phase II	1151; 681	83; 34
	Phase III	1042; 700	-117; -74

4.1.7 Hemmung weiterer potentieller mikrobieller Stickstoff-Stoffwechselwege

Natriumchlorat (NaClO_4) ist als effektiver Inhibitor der Nitrit-Oxidation (Belser und Mays 1980, Hynes und Knowles 1983), der durch die Hemmung die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits enden lässt. Durch diese Entkopplung sollte eine rasche Weiterverwertung des Nitrats (z.B. durch Dentrifikation) und damit eine mögliche Beeinflussung der NO_3^- -Exkretionsraten vermieden werden. Nach Zugabe von NaClO_4 ins Inkubationswasser von *A. aerophoba*-Schwämmen konnte allerdings das erwartete Nitrit nicht gemessen werden. Nitrat wurde hingegen in ähnlich hohen Raten ausgeschieden wie bei Kontrollschwämmen (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung der Nitrit-Oxidation durch NaClO_4 war bei *Nitrobacter winogradskyi* in Konzentrationen von 3 mM und 10 mM sehr effektiv (Belser und Mays 1980). Da die hier bei Schwämmen verwendete Konzentration von 10 mM keine Wirkung zeigte, wurde dieser Versuchsansatz nicht weiterverfolgt.

Um in *A. aerophoba*-Schwämmen mögliche mikrobielle Denitrifikationsprozesse zu inhibieren, wurden Schwämme in Natriumazid (NaN_3) inkubiert. Dieser Hemmstoff blockiert die mikrobielle Atmungskette und unterbindet somit die Nitratatmung (Denitrifikation) welche die NO_3^- -Exkretion beeinflusst. Bei diesen Versuchen war eine Vorinkubation der zu untersuchenden Schwämme erforderlich, da NaN_3 durch dessen antimikrobielle Wirkung den

NO_3^- -Nachweis inhibiert. Das eigentliche Experiment erfolgte anschließend in frischem Meerwasser, wobei drei Schwämme ohne NaN_3 -Vorinkubation als Kontrolle dienten. Sowohl die Kontroll- als auch die Testschwämme zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der NO_3^- -Ausscheidung (Daten nicht gezeigt). Auch durch eine erheblich längere Vorinkubation der Testschwämme in NaN_3 über Nacht wurde keine Steigerung der NO_3^- -Exkretion erzielt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die anaerobe Denitrifikation keine Rolle im Stickstoffkreislauf von *A. aerophoba* spielt.

4.1.8 Ammonium- und Nitratausscheidung in anderen Schwammarten

Die Ausscheidung von NH_4^+ und NO_3^- wurde auch in drei weiteren Schwammarten getestet. Zur Verfügung standen der ebenfalls bakterienhaltige Schwamm *Chondrosia reniformis*, sowie die bakterienfreien Schwammarten *Tethya* sp. und *Dysidea avara*. *C. reniformis* zeigte eine ähnliche saisonal variable NH_4^+ -Exkretion wie *A. aerophoba*. Während im April kein NH_4^+ ausgeschieden wurde (Abb. 4-8 A), war die NH_4^+ -Exkretionsrate im September sehr hoch (Abb. 4-8 B). Auch die NO_3^- -Ausscheidungsrate im April war in *C. reniformis* ähnlich hoch wie in *A. aerophoba* (Abb. 4-8 A). Im September allerdings konnte keine NO_3^- -Exkretion festgestellt werden (Abb. 4-8 B). Eine Zusammenfassung der Exkretionsraten befindet sich in Tabelle 4-4.

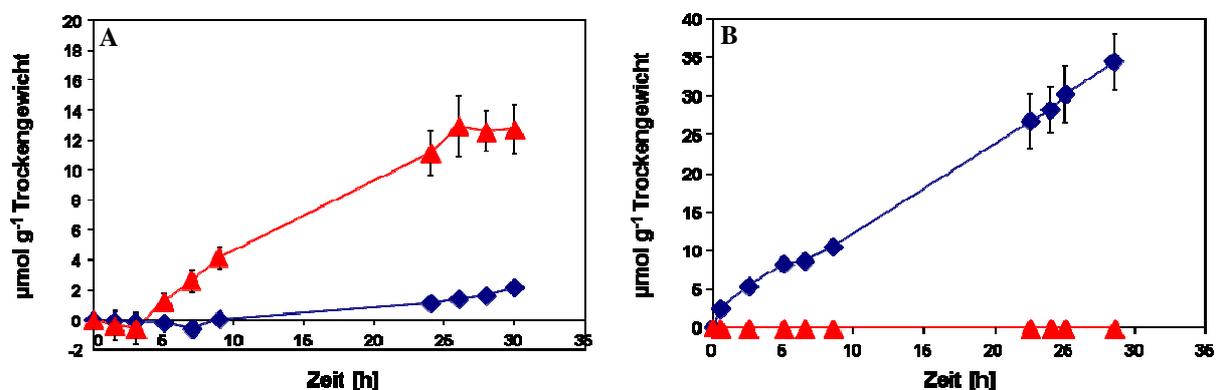


Abbildung 4-8: Ammonium- (♦) und Nitrat- (▲) Ausscheidung in *Chondrosia reniformis* ($n=3 \pm \text{SEM}$) im April (A) und September (B). Man beachte die unterschiedliche Einteilung der y-Achse.

Erwartungsgemäß zeigten die getesteten bakterienfreien Schwämme *Tethya* sp. und *Dysidea avara* keinerlei NO_3^- -Ausscheidung (Abb. 4-9 A-C). Die saisonal variable NH_4^+ -Ausscheidung zeigten die bakterienfreien Schwämme ebenso wie die bakterienhaltigen. Im Frühjahr zeigten beide Schwammarten eine geringe NH_4^+ -Exkretion (Abb. 4-9 A und C). Im September zeigte *Tethya* sp. eine achtfach höhere NH_4^+ -Ausscheidung als im April (Abb. 4-9 B). Eine Zusammenfassung der Exkretionsraten befindet sich in Tabelle 4-4.

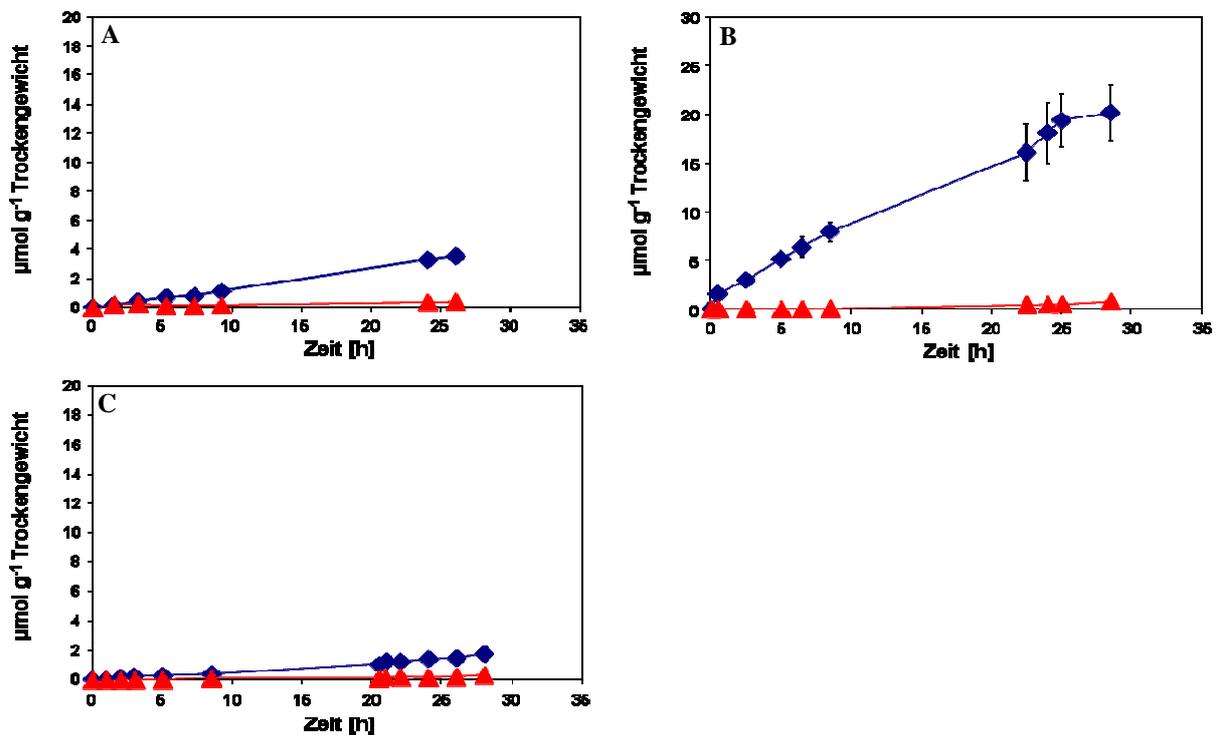


Abbildung 4-9: Ammonium- (◆) und Nitrat- (▲) Konzentrationen nach Inkubation von Individuen der bakterienarmen Schwammarten *Tethya* sp. ($n=3 \pm \text{SEM}$) im April (A) und September (B) und *Dysidea avara* ($n=3 \pm \text{SEM}$) im Mai (C).

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der NH_4^+ - und NO_3^- - Ausscheidungsraten [$\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$] in anderen bakterienarmen und -reichen Mittelmeerschwämmen.

Art		Saison	NH_4^+ -Ausscheidung	NO_3^- - Ausscheidung
bakterienhaltig	<i>Chondrosia reniformis</i>	April	-20 ± 11	509 ± 88
		September	1389 ± 93	0
bakterienarm	<i>Tethya</i> sp.	April	118 ± 9	5 ± 20
		September	975 ± 133	4 ± 4
	<i>Dysidea avara</i>		100 ± 13	25 ± 18

4.1.9 Saisonabhängige Ammoniumaufnahme in *A. aerophoba*

Um zu untersuchen, ob *Aplysina*-Schwämme zusätzlich angebotenes NH_4^+ aufnehmen können, wurden Schwämme zu unterschiedlichen Jahreszeiten in NH_4^+ inkubiert. Generell erfolgte die NH_4^+ -Aufnahme im Frühjahr zumindest in den ersten Stunden der Inkubation sehr schnell, während im weiteren Verlauf der Experimente die NH_4^+ -Aufnahmerate sank. Im April wurde die Aufnahme von $100 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ NH_4^+ durch *A. aerophoba* getestet. Im Experiment bei $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ -Zugabe wurde es bis zum dritten Messpunkt ($t = 3\text{h}$) mit einer Rate von ca. $-3 \mu\text{M g}^{-1}$ Trockengewicht h^{-1} aufgenommen. NO_3^- wurde mit einer etwa 2,6-fach höheren, aber statistisch nicht signifikanten Rate im Vergleich zur Inkubation ohne NH_4^+ -Zugabe ausgeschieden. (Abb. 4-10 A). In einem weiteren Experiment wurden drei *A. aerophoba*-Schwämme in $200 \mu\text{M}$ NH_4^+ inkubiert. Bis zum dritten Messpunkt ($t = 4\text{h}$) erfolgte die NH_4^+ -Aufnahme mit der höchsten je gemessenen Rate im Rahmen dieser Arbeit ($-4,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ Trockengewicht h^{-1}). In diesem Experiment war die NO_3^- -Exkretionsrate um das Vierfache höher als im Experiment ohne NH_4^+ -Zugabe (Abb. 4-10 B). Im Mai zeigten die getesteten Individuen ebenfalls eine starke Aufnahme von NH_4^+ , das in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ins Inkubationswasser zugegeben wurde. In den ersten zwei Stunden des Experiments wurde NH_4^+ mit einer ähnlich hohen Rate aufgenommen wie im April bei Zugabe von $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ (Abb. 4-10 C). Im weiteren Verlauf wurde NH_4^+ ausgeschieden, anstatt aufgenommen (Abb.

4-10 D). NO_3^- wurde mit einer signifikant 3,4fach höheren Rate ausgeschieden (Abb. 4-10 D). Im August wurde NH_4^+ nicht durch *Aplysina*-Schwämme aufgenommen und die NO_3^- -Ausscheidung war nicht erhöht im Vergleich zu Experimenten ohne NH_4^+ -Zugabe (Abb. 4-10 D). Die Aufnahme- und Exkretionsraten sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. In Summe konnte gezeigt werden, dass *A. aerophoba*-Schwämme im Frühjahr, aber nicht im Sommer der NH_4^+ -Aufnahme befähigt sind.

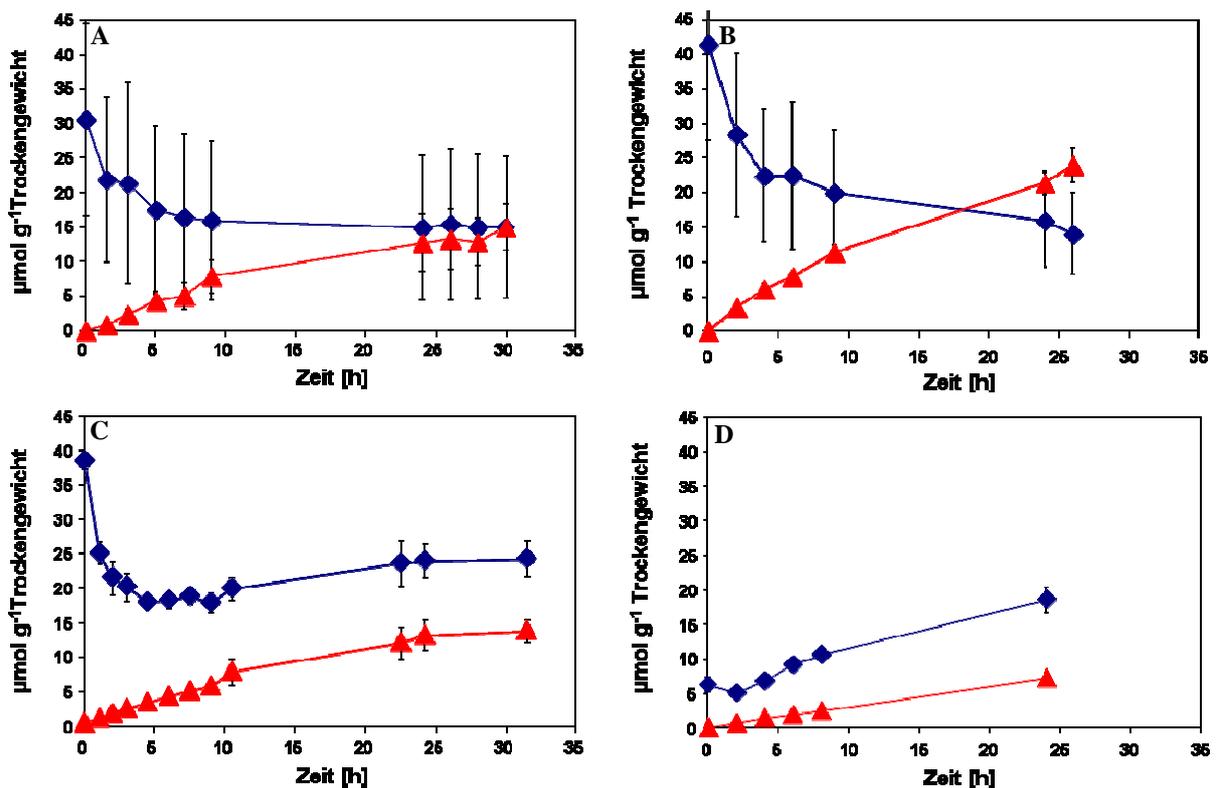


Abbildung 4-10: Ammoniumaufnahme (\blacklozenge) und Nitratexkretion (\blacktriangle) in *A. aerophoba* (jeweils $n=3 \pm \text{SEM}$) im April bei Zugabe von 100 μM (A) und 200 μM NH_4^+ (B), im Mai bei Zugabe von 100 μM NH_4^+ (C), im August bei Zugabe von 30 μM NH_4^+ .

Nitrataufnahme in *A. aerophoba*

Um *A. aerophoba*-Schwämme auf eine mögliche NO_3^- -Aufnahme zu testen, wurden drei Individuen in 100 μM NO_3^- inkubiert. Anstelle einer NO_3^- -Aufnahme wurde eine NO_3^- -Ausscheidung mit einer Rate von $102 \pm 22 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Trockengewicht h}^{-1}$ vermerkt. Sowohl NO_3^- als auch NH_4^+ ($208 \pm 16 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Trockengewicht h}^{-1}$) wurde in Raten ausgeschieden, die denen der Kontrollen sehr ähnelten (Abb. 4-11). Folglich scheint NO_3^- keine Stickstoffquelle für *A. aerophoba* darzustellen.

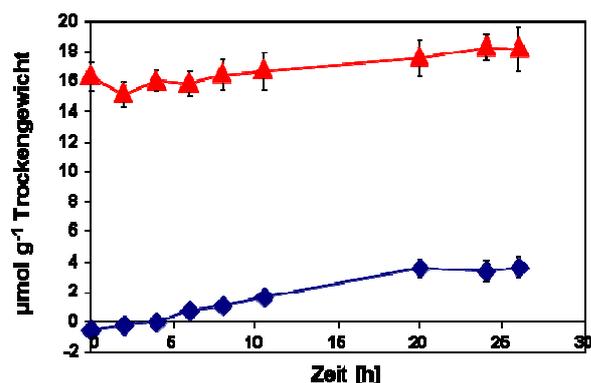


Abbildung 4-11: Ammonium- (♦) und Nitrat- (▲) Ausscheidung in *A. aerophoba* (n=3 ± SEM) bei Zugabe von 100 µM Nitrat im Mai.

Tabelle 4-5: Zusammenfassung der saisonal abhängigen NH₄⁺-Aufnahmeraten [nmol g⁻¹ h⁻¹] in den ersten Stunden der Inkubation und die durch NH₄⁺-Zugabe stimulierten NO₃⁻-Ausscheidungsrate [nmol g⁻¹ h⁻¹] im Vergleich zur normalen Inkubation aus Kapitel 4.1.3. Negative Zahlen zeigen sinkende Werte, also eine Aufnahme an. *,*-Symbole zeigen die Signifikanz der Stimulation gegenüber der normalen Inkubation; (Mann-Whitney-U-Test: * p = 0,05; ** p>0,01); # Rate über den gesamten Experimentzeitraum, da die NH₄⁺-Exkretion in den ersten Stunden kaum nachweisbar war.

Saison	NH ₄ ⁺ -Ausscheidung	NO ₃ ⁻ -Ausscheidung	Ammonium-Stimulation	
			NH ₄ ⁺ -Aufnahme/Ausscheidung	NO ₃ ⁻ -Ausscheidung
April	-12 ± 3	326 ± 117	-4747 ± 1073 (200 µM)	1325 ± 117**
			-3086 ± 534 (100 µM)	852 ± 245
Mai	55 ± 10	180 ± 46	-2838 ± 269 (100 µM)	614 ± 124*
	140 ± 16 [#]	154 ± 36 [#]		
	6 d	197 ± 97		
11 d	161 ± 17	166 ± 125		
	254 ± 97			
August	706 ± 65	291 ± 40	557 ± 54 (30 µM)	250 ± 64

4.1.10 Hemmung der Ammoniumaufnahme durch Inhibitor

In den unter Punkt 4.1.9 beschriebenen Aufnahmeexperimenten fiel auf, dass *A. aerophoba*-Schwämme zusätzliches NH₄⁺ zumindest im Frühjahr sehr stark aufnahmen und möglicherweise Stickstoff zu diesem Zeitpunkt limitiert ist. Um zu testen, ob der beobachtete erhöhte Stickstoffbedarf allein durch den mikrobiellen Prozess der Ammoniak-Oxidation zu erklären ist, oder ob anderen mikrobielle Prozesse (z. B. NH₄⁺-Assimilation) eine

entscheidende Rolle spielen, sollte in einem weiteren Experiment NH_4^+ zugegeben, jedoch die mikrobielle Nitrifikation gehemmt werden. Für diesen Versuch wurden $200 \mu\text{M NH}_4^+$ und 10 mg/l Nitrapyrin gleichzeitig ins Inkubationswasser gegeben. Die NH_4^+ -Konzentration nahm während des Experiments nur geringfügig mit einer Rate von $-173 \pm 94 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Trockengewicht h}^{-1}$ ab (Abb. 4-12), wobei die individuellen Raten sehr stark variierten. Die NO_3^- -Exkretion war sehr gering ($31 \pm 14 \text{ nmol g}^{-1} \text{ Trockengewicht h}^{-1}$). Durch die Zugabe von Nitrapyrin ergab sich bezüglich der NH_4^+ -Aufnahme eine Differenz von ca. 2600 bis zu ca. 4500 $\text{nmol g}^{-1} \text{ Trockengewicht h}^{-1} \text{ NH}_4^+$, das im April von *A. aerophoba* zusätzlich aufgenommen wurde, jedoch nicht durch die Zugabe des Hemmstoffs nicht durch Nitrifizierer erklärbar ist.

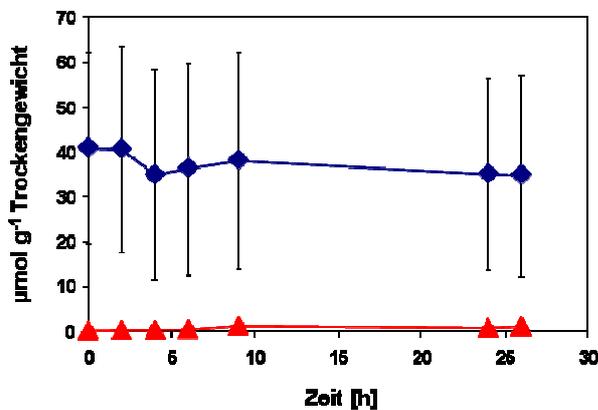


Abbildung 4-12: Ammoniumaufnahme (◆) und Nitrateausscheidung (▲) durch *A. aerophoba* ($n=3 \pm \text{SEM}$) im April bei Zugabe von $200 \mu\text{M NH}_4^+$ und gleichzeitiger Hemmung der mikrobiellen Nitrifikation durch Zugabe von 10 mg/l Nitrapyrin.

4.1.11 Ammoniumaufnahme in anderen Schwammarten

Die Ammoniumaufnahme wurde auch für *Chondrosia reniformis* getestet. Nach Zugabe von $200 \mu\text{M NH}_4^+$ nahm *C. reniformis* dieses im Vergleich zu *A. aerophoba* mit einer viel geringeren Rate auf (Abb. 4-13 A). Die NO_3^- -Exkretionsrate war etwa nur ein sechstel so hoch (Abb. 4-13 A) als die von *C. reniformis*-Schwämmen bei normaler Inkubation ohne NH_4^+ -Zugabe.

Weiterhin wurden *Tethya* sp.-Schwämme in $200 \mu\text{M NH}_4^+$ inkubiert ($n=3$), jedoch konnte eine Aufnahme von NH_4^+ hierbei nicht festgestellt werden. Eine NO_3^- -Exkretion konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 4-13 B). Die Aufnahme- bzw. Ausscheidungsdaten sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

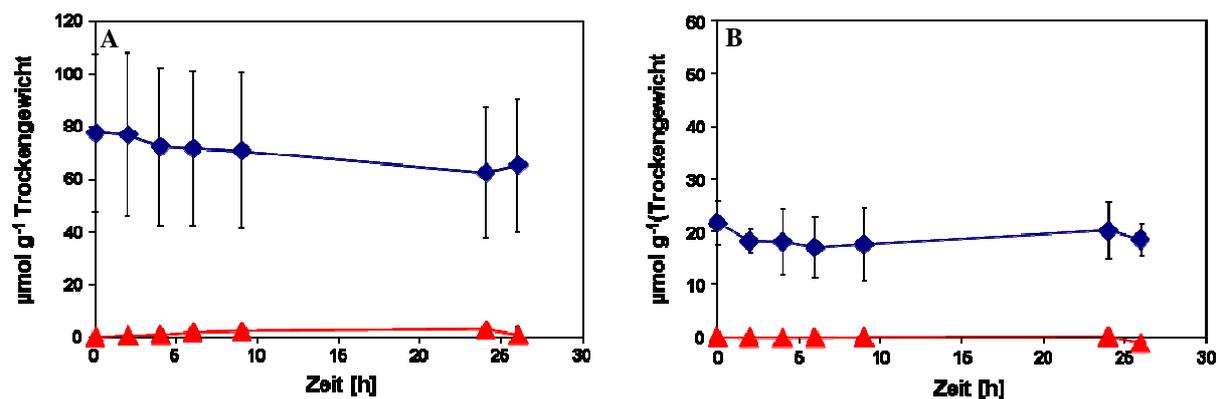


Abbildung 4-13: Ammonium- (\diamond) und Nitrat- (\blacktriangle) Konzentrationen nach Inkubation von *Chondrosia reniformis* (A) und *Tethya sp.* (B) (jeweils $n=3 \pm \text{SEM}$) im April nach Zugabe von 200 μM Ammonium.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der NH_4^+ - und NO_3^- - Ausscheidungsraten [$\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$] in weiteren bakterienarmen und -haltigen Mittelmeerschwämmen, sowie NH_4^+ -Aufnahme- und daraus folgende NO_3^- - Ausscheidungsraten. „-“ keine Werte vorhanden.

Art	Saison	NH_4^+ - Ausscheidung	NO_3^- - Ausscheidung	Ammonium-Stimulation	
				NH_4^+ - Aufnahme	NO_3^- - Ausscheidung
bakterienhaltig <i>Chondrosia reniformis</i>	April	-20 ± 11	509 ± 88	-504 ± 256	79 ± 64
	September	1389 ± 93	0	-	-
bakterienarm <i>Tethya sp.</i>	April	118 ± 9	5 ± 20	5 ± 36	0
	September	975 ± 133	4 ± 4	-	-
<i>Dysidea avara</i>		100 ± 13	25 ± 18	-	-

4.2 Molekularer Nachweis Ammoniak-oxidierender Bakterien und Archaeen in Schwämmen

4.2.1 Bakterielle 16S rRNA-Gene

Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB) sollten mittels PCR in den Schwämmen *A. aerophoba* [aus Frankreich (F) und Kroatien (K)], *C. reniformis*, *D. avara*, *Tethya sp.*, *C. crambe* (alle aus Kroatien), *T. swinhoei* (Palau) und *X. muta* (Karibik) nachgewiesen werden.

Als Kontrollen dienten in dieser Studie Meerwasser und Sedimentproben aus Kroatien. Durch die Verwendung von für Ammoniak-oxidierende Betaproteobakterien spezifische PCR-Primer (AOB189f und AOB1224r) konnte für alle untersuchten Schwamm-, Meerwasser- und Sediment-DNAs ein ca. 1035 bp langes DNA-Fragment amplifiziert werden. Einzige Ausnahme war die DNA des Schwammes *Chondrosia reniformis*, für die kein PCR-Fragment der richtigen Größe gewonnen werden konnte. Insgesamt wurden ca. 580 Klone mittels RFLP-Analyse untersucht und pro Muster und Schwamm jeweils ein repräsentativer Klon sequenziert. Fünf Sequenzen wurden mittels ‚Pintail‘ als Chimären identifiziert und daher verworfen. Mit den verbleibenden 28 Sequenzen wurde zusammen mit dazugehörigen Referenzsequenzen ein Alignment erstellt und anschließend mittels ARB phylogenetisch analysiert. Alle in dieser Studie amplifizierten 16S rRNA-Gene konnten dem Cluster 1 der *Nitrosospira* (Betaproteobakterien) zugeordnet werden (Abb. 4-14). Die bisher bekannten marinen *Nitrosospira* gehören alle dieser Gruppe an und sind ausnahmslos nichtkultiviert. Alle Sequenzen dieses Clusters wiesen sehr hohe Homologien zueinander auf (95,3-100%), was eine weitere Auflösung innerhalb dieses Clusters unmöglich machte. Vier aus bakterienhaltigen Schwämmen stammende Sequenzen [*T. swinhoei* Klon 10, *X. muta* Klone 2 und 61, *A. aerophoba* Klon (F)] bildeten ein Cluster mit einer sehr hohen Homologie von 99,4-100% (Abb. 4-14, mit einem Stern markiert), jedoch eher moderaten ‚Bootstrap‘-Werten (77/ 75). Ein weiteres Cluster bilden die Sequenzen von *A. aerophoba* Klon (K) 5, *T. swinhoei* Klon 9 und *X. muta* Klon 5. Allerdings sind diese Sequenzen mit der von *C. crambe* Klon 58 und zwei Nicht-Schwammsequenzen so eng verwandt, sodass keine weitere Auflösung möglich war. (Abb. 4-14). Die Meerwasser-Klone 6, 7 und 46, sowie der *A. aerophoba*-Klon (K) 10 bilden ebenfalls ein Cluster mit einer Homologie von 98,0-99,6%. Eine Amplifikation von 16S rRNA-Genen Ammoniak-oxidierender Betaproteobakterien der Art *Nitrosomonas* verlief negativ, obwohl die verwendeten Primer keinen ‚Mismatch‘ zu bekannten *Nitrosomonas*-Sequenzen aufwiesen. Durch Verwendung des für Ammoniak-oxidierende Gammaproteobakterien spezifischen Primerpaares NOC1 und NOC2 konnte für keine der getesteten DNAs ein entsprechendes Produkt amplifiziert werden.

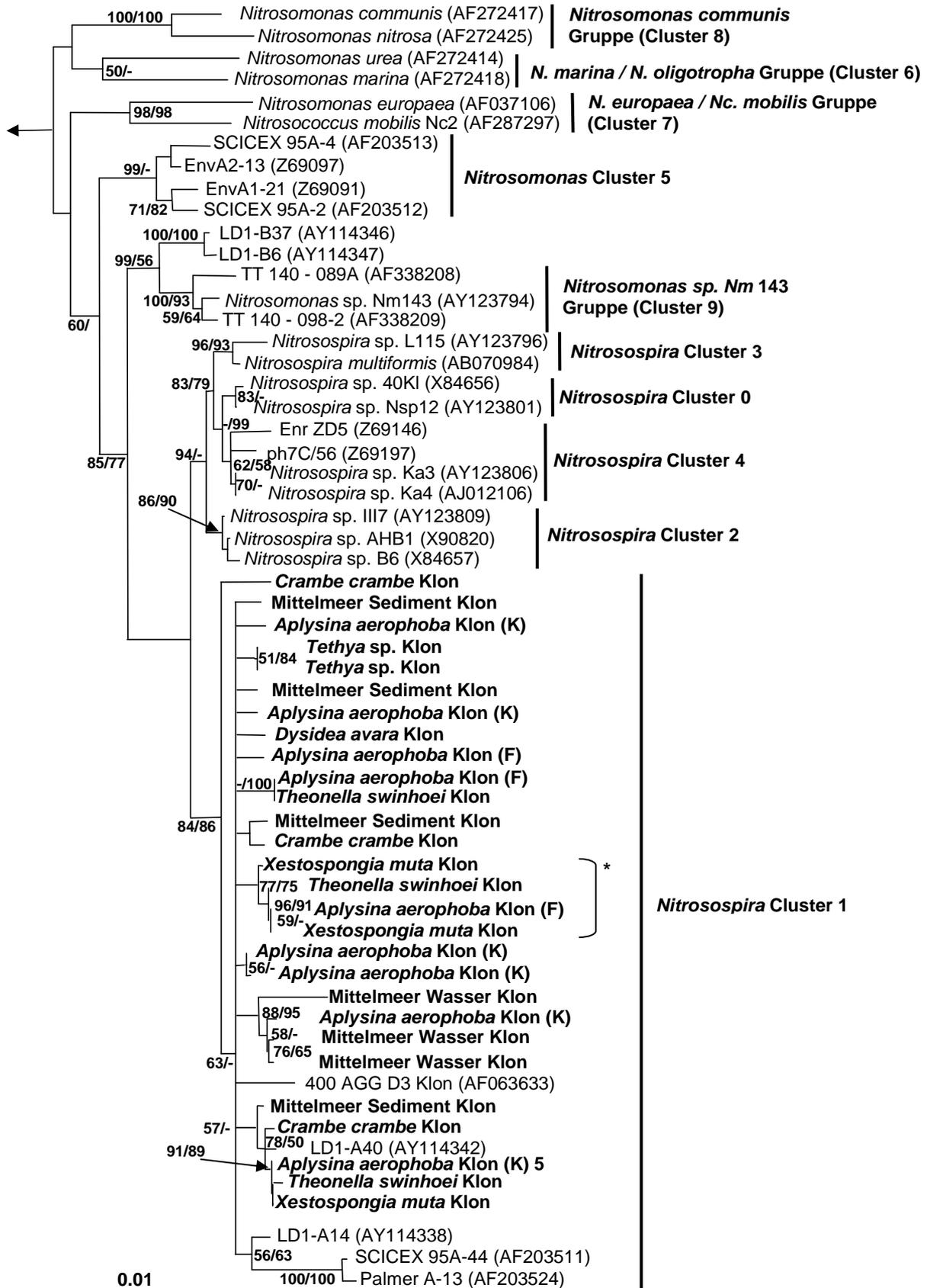


Abbildung 4-14: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA-Genen (1024 Nukleotide) Ammoniak-oxidierender Betaproteobakterien aus marinen Schwämmen, Sediment und Meerwasser sowie Referenzsequenzen (Sequenzen aus dieser Arbeit sind fett dargestellt). „Bootstrap“-Werte sind für Distanz- und „Parsimony“-Analysen angegeben. *Aplysina aerophoba* wurde sowohl in Kroatien (K) als auch in Frankreich (F) gesammelt. Meerwasser und Sedimentproben stammen aus Kroatien. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe [*Nitrosococcus oceani* Nc1 (AJ298727)] mit welcher der Baum gewurzelt wurde.

4.2.2 Bakterielle *amoA*-Gene

Durch die Verwendung der Primer A189 und *amoA*-2R konnte aus allen getesteten DNAs ein Fragment mit 670 bp Länge amplifiziert werden. In dieser Studie wurden ausschließlich bakterienhaltige Schwämme (*A. aerophoba* aus Kroatien (K) und Frankreich (F), *X. muta* und *T. swinhoei*) untersucht. Als Kontrolle wurde Meerwasser aus Frankreich verwendet. Nach der Reinigung der PCR-Fragmente sowie deren Klonierung wurden insgesamt ca. 250 Klone mittels RFLP-Analyse auf ihre Diversität hin überprüft. Repräsentative Klone der jeweiligen RFLP-Muster wurden sequenziert und analysiert. Nach Verwerfen von Sequenzen, die keine Homologie zu *amoA*-Einträgen in der Onlinedatenbank aufwiesen, verblieben insgesamt 21 Sequenzen für eine ausführliche phylogenetische Analyse. Alle in dieser Studie gewonnenen Sequenzen hatten eine Homologie von 96,6-100% zueinander und fielen zusammen in ein Cluster innerhalb der *Nitrospira*, das durch den in Abb. 4-15 angegebenen ‚MrBayes‘-Wert (0,99) sehr gut unterstützt wurde. Die nächsten verwandten Sequenzen stammten von ebenfalls nicht-kultivierten Bakterien der Gattung *Nitrospira* aus marinen Habitaten (Ostsee und Pazifik) und waren zu 90,1-93,1 % homolog zu denen aus marinen Schwämmen und Mittelmeer-Wasser. Insgesamt schien die Diversität des *amoA*-Gens in der phylogenetischen Analyse sehr viel geringer, als die der 16S rRNA-Gene. Eine weitere Auflösung war somit nicht möglich (Abb. 4-15). Auch unter Verwendung des *amoA*-Gens als phylogenetischer Marker konnten keine DNA-Fragmente aus Bakterien der Gattungen *Nitrosomonas* oder *Nitrosococcus* amplifiziert werden, obwohl die verwendeten PCR-Primer an die entsprechenden Regionen der *amoA*-Gene dieser Bakteriengruppen hätten binden können.

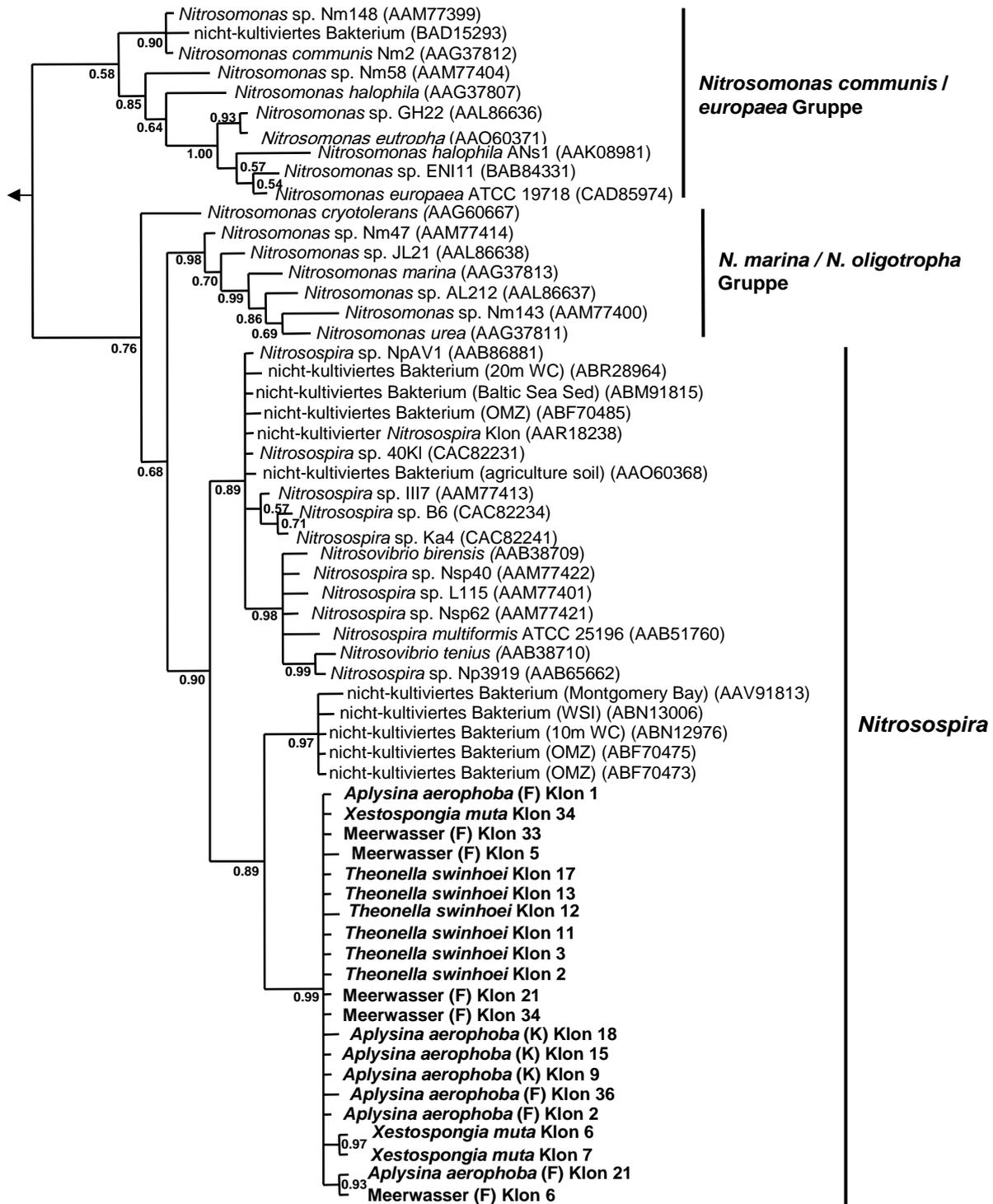


Abbildung 4-15: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf AmoA-Sequenzen (131 Aminosäuren) Ammoniak-oxidierender Betaproteobakterien aus marinen Schwämmen, Sedimentproben und Meerwasser sowie Referenzsequenzen (Sequenzen aus dieser Arbeit sind fett dargestellt). *Aplysina aerophoba* wurde sowohl in Kroatien (K) als auch in Frankreich (F) gesammelt. Meerwasser stammte aus Frankreich (F). OMZ: oxygen minimum zone, WSI: water sediment interface, WC: water column. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe [*Nitrosococcus* sp. C-113 (AAF03938) und *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 (AAB57809)] mit denen der Baum gewurzelt wurde.

4.2.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung Ammoniak-oxidierender Bakterien

Um die Anwesenheit und die relative Häufigkeit von marinen Ammoniak-oxidierenden Bakterien innerhalb des mikrobiellen Konsortiums des Schwammes *A. aerophoba* zu bestimmen, wurden spezifische 16S rRNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) verwendet. Diese FISH-Experimente wurden an physikalisch vom Schwammgewebe abgetrennten SAB (Schwamm-assoziierte Bakterien) -Präparationen durchgeführt. Hybridisierungen mit dem EUB-Sonden-Mix resultierten in sehr hellen, zahlreichen Signalen, die sich mit ca. 98% aller mit DAPI gefärbten Zellen deckten. Zusätzlich wurde eine Sonde benutzt, die spezifisch an die Ribosomen von *Nitrosospira*-Zellen des marinen Clusters 1 bindet. Durch die Verwendung der Sonde NspCL1_249 wurden nur wenige, aber helle Signale eindeutig nachgewiesen. Nur etwa eine *Nitrosospira*-Zelle von ca. 800 eubakteriellen Signalen lagen in den *A. aerophoba*-SAB-Präparationen vor (Abb. 4-16 A und B), was ca. $12,5 \times 10^6$ Zellen pro Gramm Schwamm oder 0.125% der Gesamtzahl, bei einer angenommenen Gesamtmenge von 10^8 Mikroorganismen pro Gramm Schwamm (Frischgewicht), im Mesohyl von *A. aerophoba* entspricht.

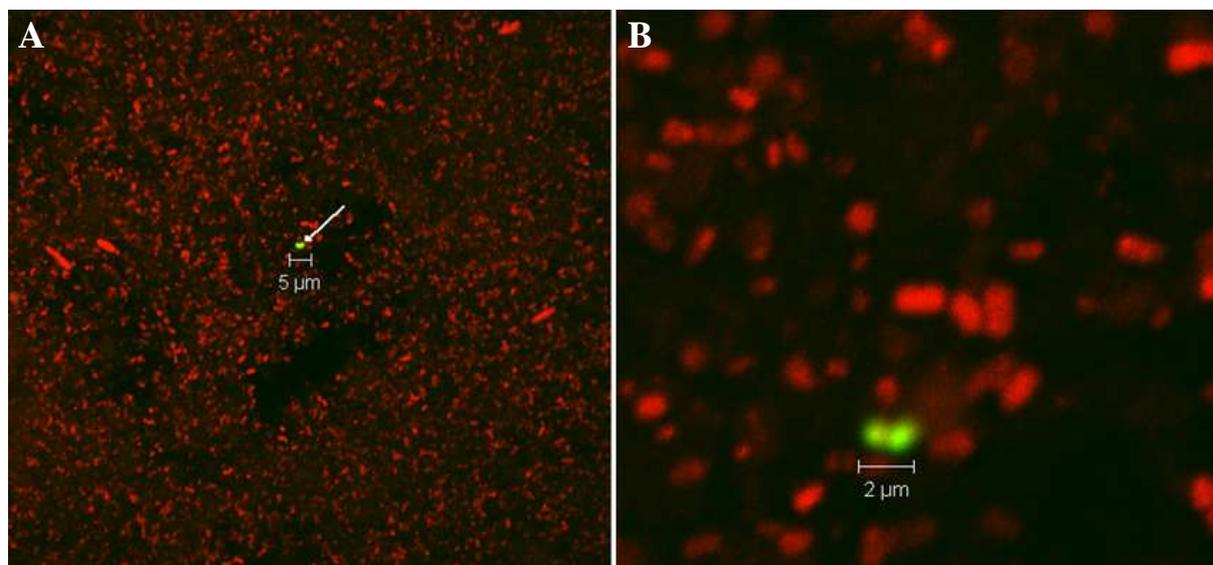


Abbildung 4-16: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Mikroorganismen-Präparationen des Schwammes *A. aerophoba* zum Nachweis von Cluster 1 *Nitrosospira*. Grün-markierte Sonde NspCL1_249 zusammen mit rot markiertem EUB-Mix (A) und digitale Vergrößerung (B).

4.2.4 Archaeale 16S rRNA-Gene

Durch die Verwendung des Archaeen-spezifischen Primerpaares Arch21F und Arch958R konnten 16S rRNA-Genfragmente von ca. 930 bp Länge für *A. aerophoba* aus Frankreich (F) und Kroatien (K), sowie für Meerwasser amplifiziert werden. Insgesamt wurden nach der Klonierung 170 Klone mittels RFLP analysiert und ausgewählte representative Klone sequenziert. Eine Sequenz wurde mittels ‚Pintail‘ als Chimäre identifiziert und verworfen. Zwei *A. aerophoba*-Sequenzen aus Frankreich und drei Sequenzen aus Kroatien konnten eindeutig dem marinen Subphylum Crenarchaea Gruppe 1 zugeordnet werden, wobei diese ausschließlich mit Sequenzen aus marinen Schwämmen von verschiedenen geografischen Habitaten zusammenfielen (Abb. 4-17) und so per Definition ein schwamm-spezifisches Cluster bildeten (Abb. 4-17 graue unterlegtes Cluster I). Die Homologien dieses Clusters waren mit 98.1-99.9 % sehr hoch. Dieses Cluster entspricht dem kürzlich identifizierten Cluster C1a- α -D innerhalb der Crenarchaeen Gruppe 1 nach Holmes and Blanch (2006) und ist durch die in Abb. 4-17 angegebenen ‚Bootstrap‘-Werte (99/ 77) gut unterstützt. Innerhalb dieses ‚Schwamm-Clusters‘ bildeten die *A. aerophoba*-Sequenzen ein eigenständiges ‚Mittelmeer-Cluster‘ das durch sehr gute ‚Bootstrap-Werte‘ (95/ 94) gefestigt wurde. Für Meerwasser wurden zwei RFLP-Muster identifiziert. In der phylogenetischen Analyse fiel eine in die Gruppe der Euryarchaeen, die nicht im Baum dargestellt ist. Die zweite Meerwasser-Sequenz (Klon 15) fiel in die Crenarchaeen Gruppe 1, war aber nur moderat zu den Sequenzen aus *A. aerophoba* (96,9-97,2 %) (Abb. 4-17) verwandt. Ein weiteres ‚Schwamm-spezifisches‘ Cluster bildeten Sequenzen, die hauptsächlich aus *Axinella*-Schwämmen stammten (Abb. 4-17 graue unterlegtes Cluster II). In diesen Cluster fiel auch der aus *A. mexicana* stammende *C. symbiosum*, aber keine der aus *A. aerophoba* amplifizierte Sequenzen.

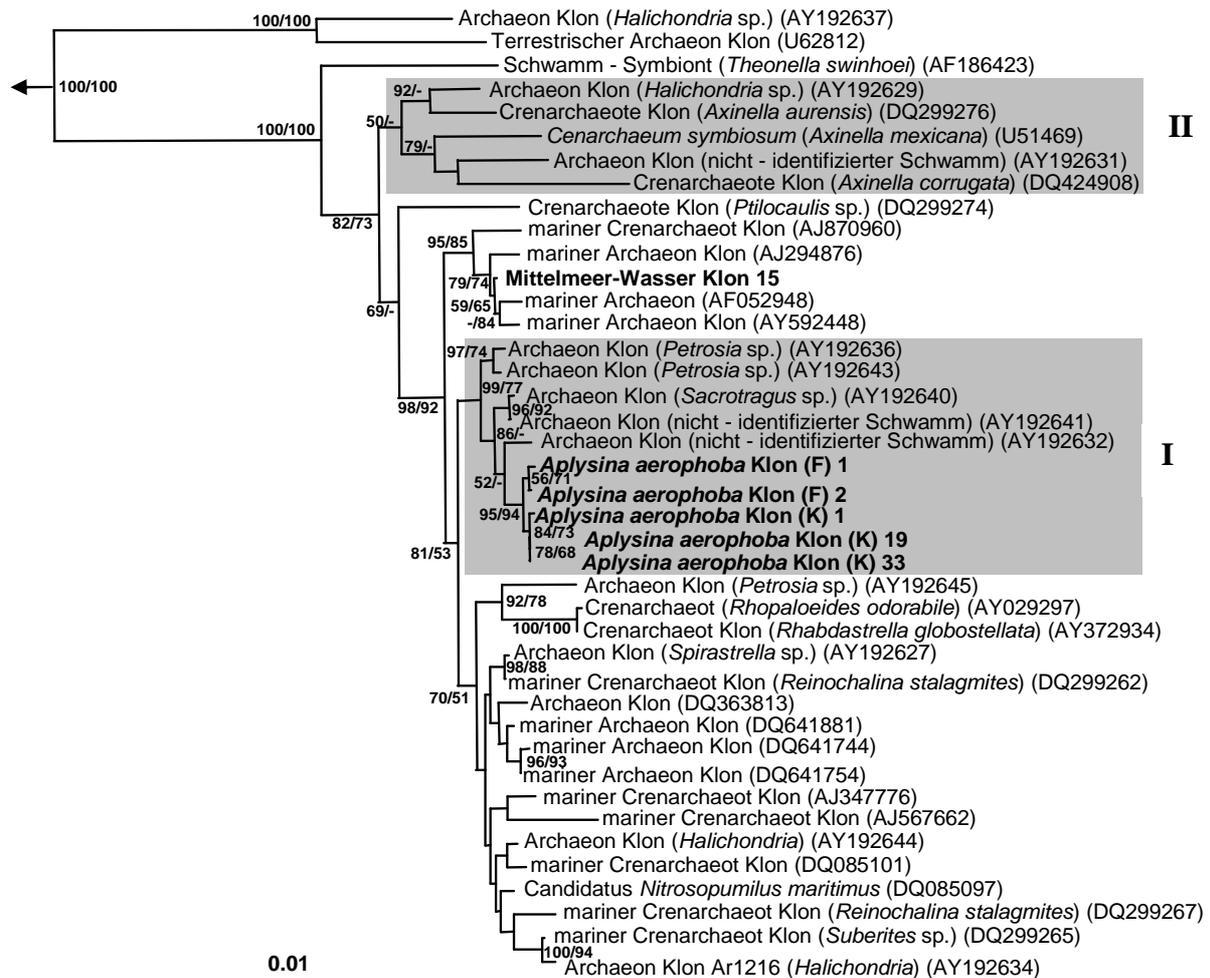


Abbildung 4-17: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA-Genen (826 Nukleotide) Ammoniak-oxidierender Archaeen aus marinen Schwämmen und Meerwasser sowie Referenzsequenzen (Sequenzen aus dieser Arbeit sind fett dargestellt). ‚Bootstrap‘-Werte sind für Distanz- und ‚Parsimony‘-Analysen angegeben. *Aplysina aerophoba* wurde sowohl in Kroatien (K) als auch in Frankreich (F) gesammelt. Meerwasser stammte aus Kroatien. Graue Kästen kennzeichnen ‚Schwamm-spezifische‘ Cluster. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe [*Thermococcus radiophilus* (AF479013) and *Thermococcus* sp. OGL-20P (AF394925)] mit denen der Baum gewurzelt wurde.

4.2.4 Archaeale *amoA*-Gene

Unter Verwendung der Archaeen-*amoA*-spezifischen PCR-Primer *amo111F* und *amo643R*, konnte ein ca. 530 bp langes Fragment aus *A. aerophoba*- (aus Frankreich und Kroatien) und Meerwasser-DNA gewonnen werden. Nach Klonierung und RFLP-Analyse konnten fünf verschiedene Restriktionsmuster für die Meerwasserklone identifiziert werden. Allerdings zeigte keine der zugehörigen Sequenzen eine Homologie zu den in Genbank eingetragenen *AmoA*-Datenbank-Einträgen. Die zehn Sequenzen aus *A. aerophoba* waren alle sehr eng mit denen aus marinen Crenarchaeoten, zu denen auch *Candidatus Nitrosopumilus maritimus*

gehört, verwandt (Homologie von 94,1-97,6% auf Aminosäureebene) (Abb. 4-18). Die geringen Homologien zwischen Sequenzen aus terrestrischen und marinen Habitaten (< 85%) ermöglichten eine deutliche Auflösung zwischen den Sequenzen dieser verschiedenen Lebensräume (Abb. 4-18).

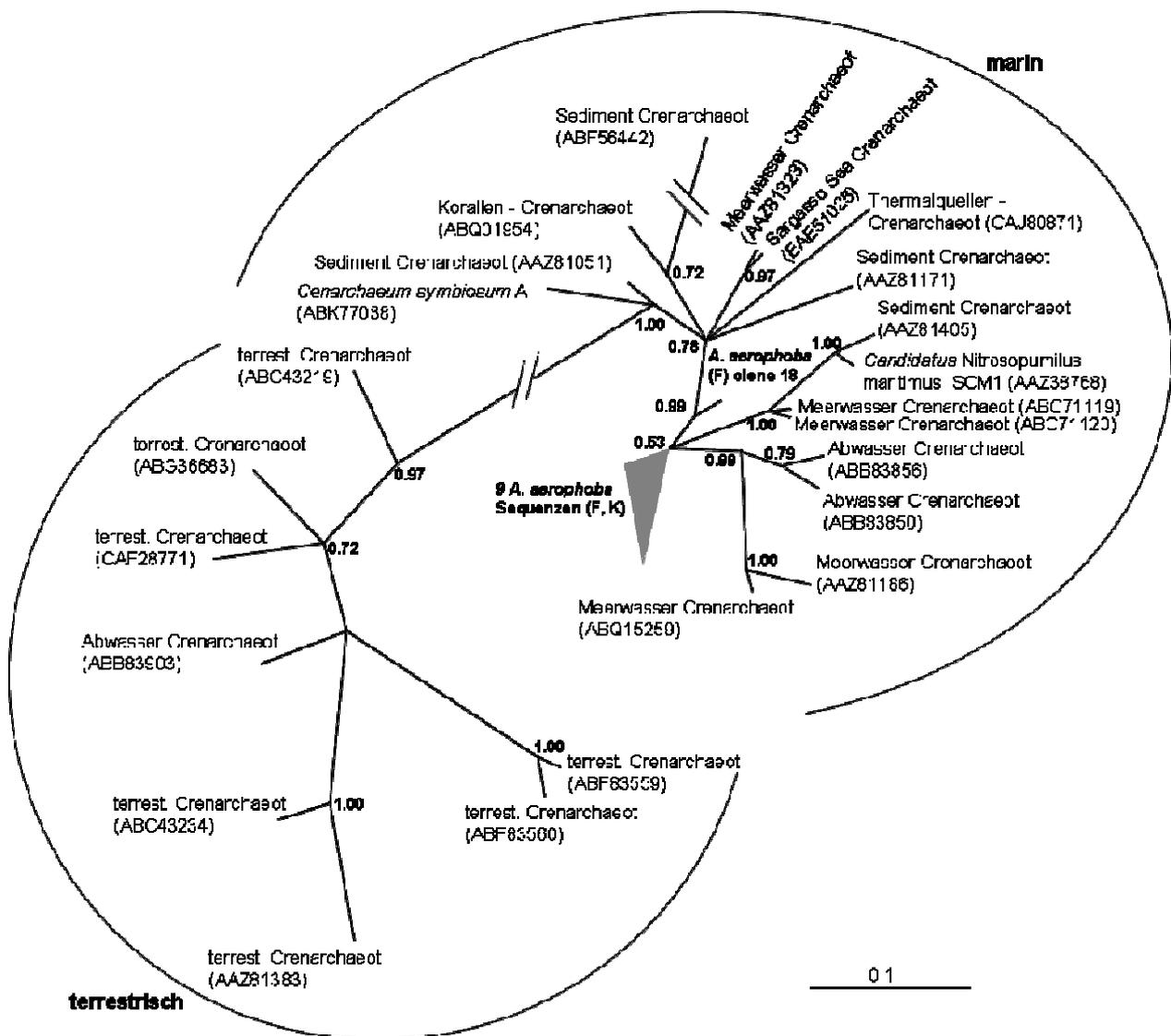


Abbildung 4-18: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf AmoA-Sequenzen (170 Aminosäuren) von Ammoniak-oxidierenden Archaeen aus marinen Schwämmen und Meerwasser sowie Referenzsequenzen (Sequenzen aus dieser Arbeit sind in fett dargestellt). *Aplysina aerophoba* wurde sowohl in Kroatien (K) als auch in Frankreich (F) gesammelt. Dieser Baum ist nicht gewurzelt. terrestr.: terrestrisch.

4.2.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung Ammoniak-oxidierender Archaeen

Um die Anwesenheit von marinen Ammoniak-oxidierenden Archaeen sowie deren relative Häufigkeit innerhalb des mikrobiellen Konsortiums von *A. aerophoba* zu bestimmen, wurden bei FISH-Experimenten Archaeen-spezifische Sonden verwendet. Diese Hybridisierungen wurden wiederum an SAB-Präparationen durchgeführt. Die sehr hellen und zahlreichen Signale bei Hybridisierungen mit dem EUB-Sonden-Mix entsprachen ca. 98% aller mit DAPI gefärbten Zellen. Durch die Verwendung der für die marine Gruppe 1 Crenarchaeen spezifischen Sonde GI-554 wurden wenige, helle Signale eindeutig nachgewiesen. Nur schätzungsweise eine von 400 eubakteriellen Zellen gehörte zu dieser Gruppe (Abb. 4-19 A und B) was ca. 25×10^6 Zellen pro Gramm Schwamm oder 0.25% der Gesamtzahl, bei einer angenommenen Gesamtmenge von 10^8 Mikroorganismen pro Gramm Schwamm (Frischgewicht), entspricht. Eine Co-Hybridisierung unter Verwendung der für marine Gruppe I-Crenarchaeen spezifischen Sonde GI-554 (grün) und der für die Umwelt-Archaeen-spezifischen Sonde Cren569 (rot) resultierte in einer Co-Lokalisation beider Signale (Abb. 4-19 C).

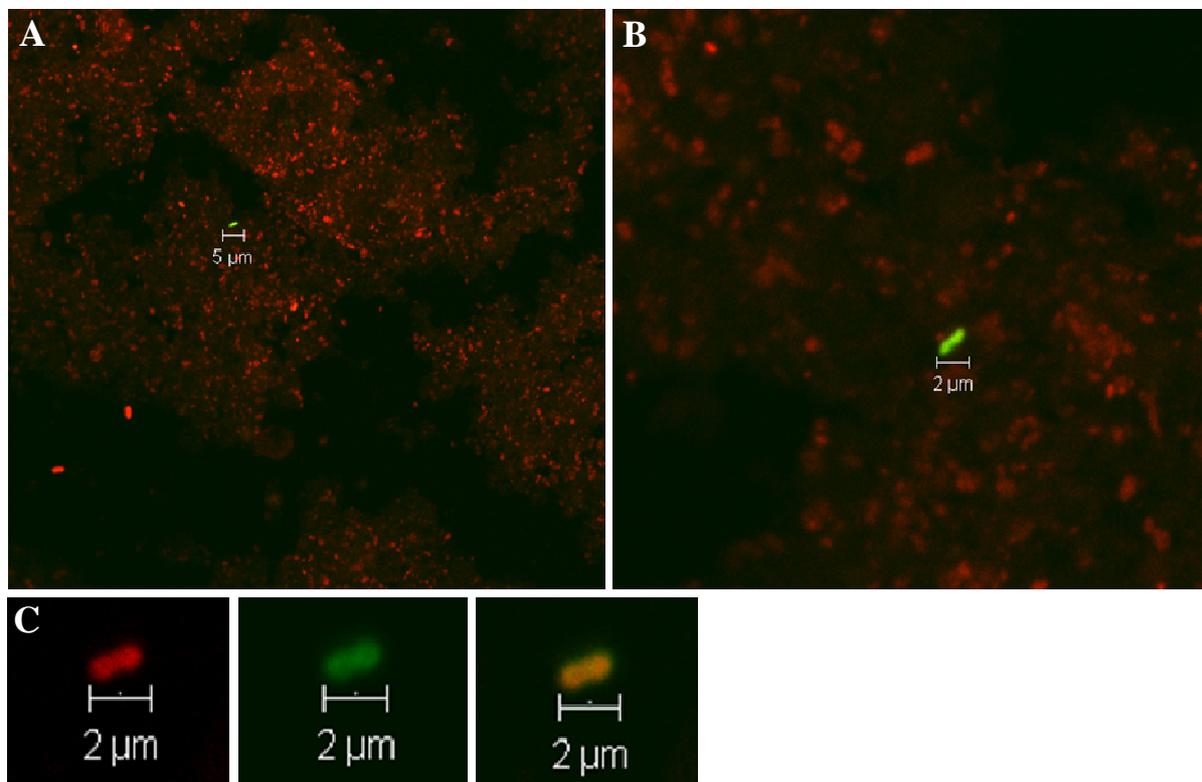


Abbildung 4-19: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an *A. aerophoba*-SAB-Präparationen zum Nachweis von crenarchaealen Gruppe 1 Archaeen mit grün-markierter Sonde GI-554 und rot-markiertem EUB-Mix (A) sowie digitale Vergrößerung (B). Co-Hybridisierung mit grün-markierter Sonde GI-554 und rot-markierter Sonde Cren569 (C).

4.2.6 Weitere 16S rRNA- sowie funktionellen Gene des mikrobiellen Stickstoffkreislaufs

Zum Nachweis von 16S rRNA-Genen von Bakterien, die zur anaeroben Ammonium-Oxidation befähigt sind (Anammox), wurden verschiedene PCR-Primer-Kombinationen verwendet, die von FISH-Sonden abgeleitet wurden. Lediglich durch die Kombination der Primer pla46f und Amx820r wurde ein DNA-Fragment amplifiziert. Nach der RFLP-Analyse und der Sequenzierung ausgewählter Klone ergab die ‚BLASTn‘-Suche Homologien zu nicht-kultivierten Vertretern des *Candidatus* Phylums Poribacteria aus *A. aerophoba*, aber keinerlei Ähnlichkeit zu 16S rRNA Genen bekannter Anammox-Bakterien. Durch Verwendung der *nirK*-spezifischen Primer nirK1F und nirK5R wurden mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Größen amplifiziert. Allerdings zeigte keines dieser PCR-Produkte Homologie zu *nirK*-Datenbankeinträgen.

4.3 Metagenomische Analysen

4.3.1 Screening einer Metagenombank auf bakterielle und archaeale 16S rRNA- sowie Ammoniak-Monooxygenase-Gene (*amoA*)

Beim Screening mit den *amoA*-spezifischen Primern A189 und *amoA*-2R wurden die Metagenomklone 4L5 und 8N3 identifiziert. Durch die Verwendung der *amoA*-Primer amo111F und amo643R wurde der Metagenomklon 58F6 identifiziert. Ein archaeales 16S rRNA-Gen wurde mittels der spezifischen Primer Arch21F und Arch958R auf dem Metagenomklon 11E13 nachgewiesen. PCRs mit den für Ammoniak-oxidierende Betaproteobakterien-spezifischen 16S rDNA Primern AOB189f und AOB1224r verliefen negativ. Die spezifischen PCRs wurden jeweils mehrfach auf die Klone selbst, als auch auf die isolierte Fosmid-DNA durchgeführt und die PCR-Produkte zur Überprüfung sequenziert. Anschließend wurden die *amoA*-tragenden Metagenomklone zum Sequenzieren des kompletten Inserts an die Firma Macrogen in Seoul/ Korea gesendet.

4.3.2 Annotation des Nitrosospira-amoA-positiven Klons 4L5

Die Genomsequenz des Klons 4L5 umfasst 43799 bp mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 57% (Abb. 4-20 A). Insgesamt wurden 29 ‚open reading frames‘ (ORFs) identifiziert, wobei 14 davon ‚hypothetische Proteine‘ darstellen (Abb. 4-20 B). Eine Zusammenstellung der ORFs inklusive hypothetischer Funktion befindet sich in Tabelle 4-7.

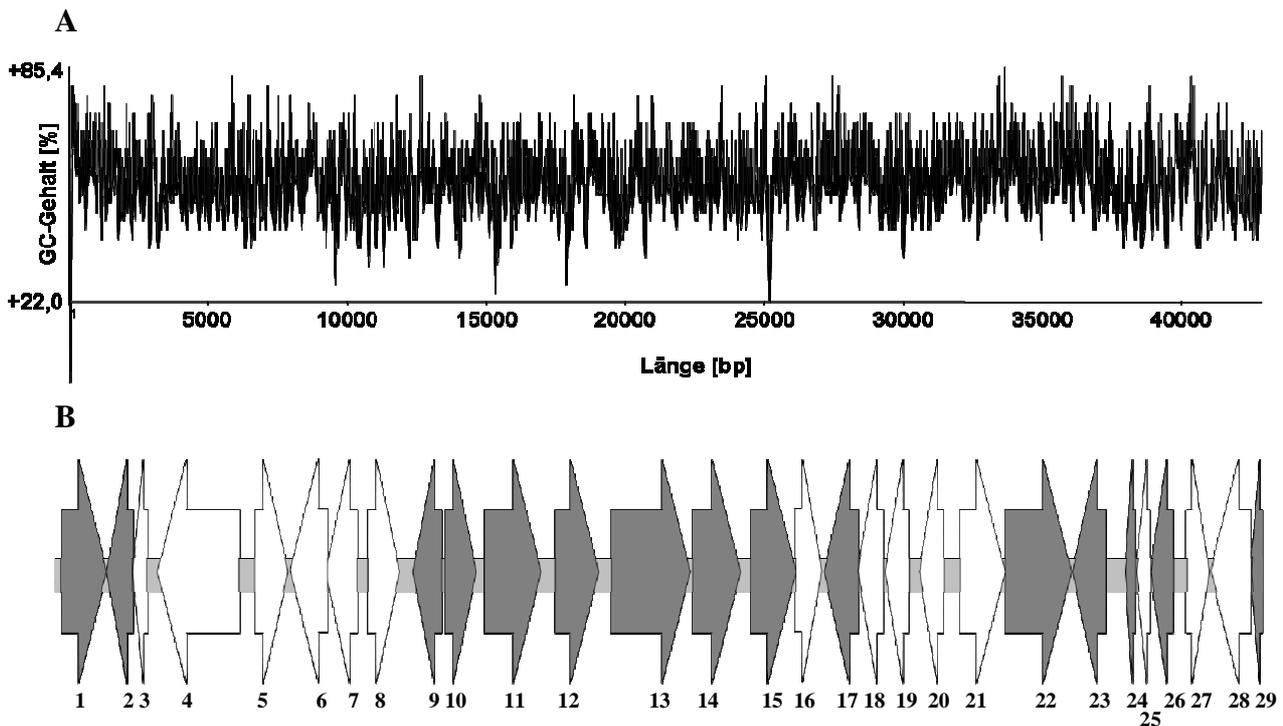


Abbildung 4-20: Darstellung des GC-Gehalts über das gesamte Fragment des Metagenomklons 4L5 (A). Physikalische Genkarte des Metagenomklons 4L5 zur Darstellung der identifizierten ORFs sowie deren Orientierung (B), ORFs mit zugeordneter Funktion sind grau, hypothetische Proteine sind weiß dargestellt.

Tabelle 4-7: ‚Open reading frames‘ (ORFs) des genomischen Fragments 4L5; Nummerierung aus Abb. 4-20 B und Lokalisation auf dem Fragment, Größe [aa]: entsprechende Größe des kodierten Proteins [Aminosäuren]; hypothetisches Genprodukt: erster ‚Blast-Hit‘ nach ‚BlastX‘-Analyse, Positive/ Homologie [%]: Identitäts-, Ähnlichkeitswerte. Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

ORF	Lokus	Größe [aa]	hypothetisches Genprodukt	Organismus	Positive/ Homologie [%]
1	93-1733	546	Penicillin-Acylase II	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	277/535 (51%)
2	1748-2710	320	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	133/288 (46%)
3	2711-3198	162	hypothetisches Protein	-	-
4	3589- 6561	991	hypothetisches Protein	-	-
5	7124- 8326	401	hypothetisches Protein	-	-
6	8413- 9771	453	hypothetisches Protein	-	-

ORF	Lokus	Größe [aa]	hypothetisches Genprodukt	Organismus	Positive/ Homologie [%]
7	9701-10840	380	hypothetisches Protein	-	-
8	11238-12377	380	hypothetisches Protein	-	-
9	12869-13915	349	Glutamin-Fructose-6- Phosphat-Transaminase	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	262/348 (75%)
10	14020-15159	380	Acyl-CoA- Dehydrogenase	<i>Carboxydotherrmus</i> <i>hydrogenoformans</i> Z-2901	262/377 (69%)
11	15449-17527	693	Translations- Elongation- Factor G	<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	450/697 (64%)
12	18037-19608	524	glr4229 Glykosyl Transferase Familie 2	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	257/436 (58%)
13	20073-22940	965	DNA-Polymerase I	<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	574/948 (60%)
14	23016-24752	579	Arginyl-tRNA- Synthetase	<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	362/574 (63%)
15	25121-26779	553	D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J- 10-fl	348/525 (66%)
16	26779-27693	305	hypothetisches Protein	-	-
17	27786-29030	415	Acetyl-Lysin Deacetylase	<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	237/394 (60%)
18	29303-29950	216	hypothetisches Protein	-	-
19	29996-30886	297	hypothetisches Protein	-	-
20	31257-32141	295	hypothetisches Protein	-	-
21	32729-34368	547	hypothetisches Protein	-	-
22	34369-36771	801	Transglutaminase	<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	185/437 (42%)
23	36806-38023	406	hypothetisches Protein	-	-
24	38717-39097	127	Laktoylglutathion-Lyase	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	53/122 (43%)
25	39125-39646	176	hypothetisches Protein	-	-
26	39653-40462	270	Glucose-1- Dehydrogenase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	165/270 (61%)
27	40966-41772	174	hypothetisches Protein	-	-
28	41827-43290	270	hypothetisches Protein	-	-
29	43280-43738	152	Homocystein-S- Methyltransferase	Nicht-kultiviertes Alphaproteobakterium EBAC2C11	58/127 (45%)

Fortsetzung Tabelle 4-7.

4.3.3 Annotation des Nitrosospira-amoA-positiven Klons 8N3

Die Genomsequenz des Klons 8N3 umfasst 38792 bp mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 55,6% (Abb. 4-21 A). Insgesamt wurden 32 ‚open reading frames‘ (ORFs) identifiziert, wobei neun davon ‚hypothetische Proteine‘ ohne zugewiesene Funktion (Abb. 4-21 B) darstellen. Eine Zusammenstellung der ORFs sowie ihrer hypothetischen Funktion befindet sich in Tabelle 4-8.

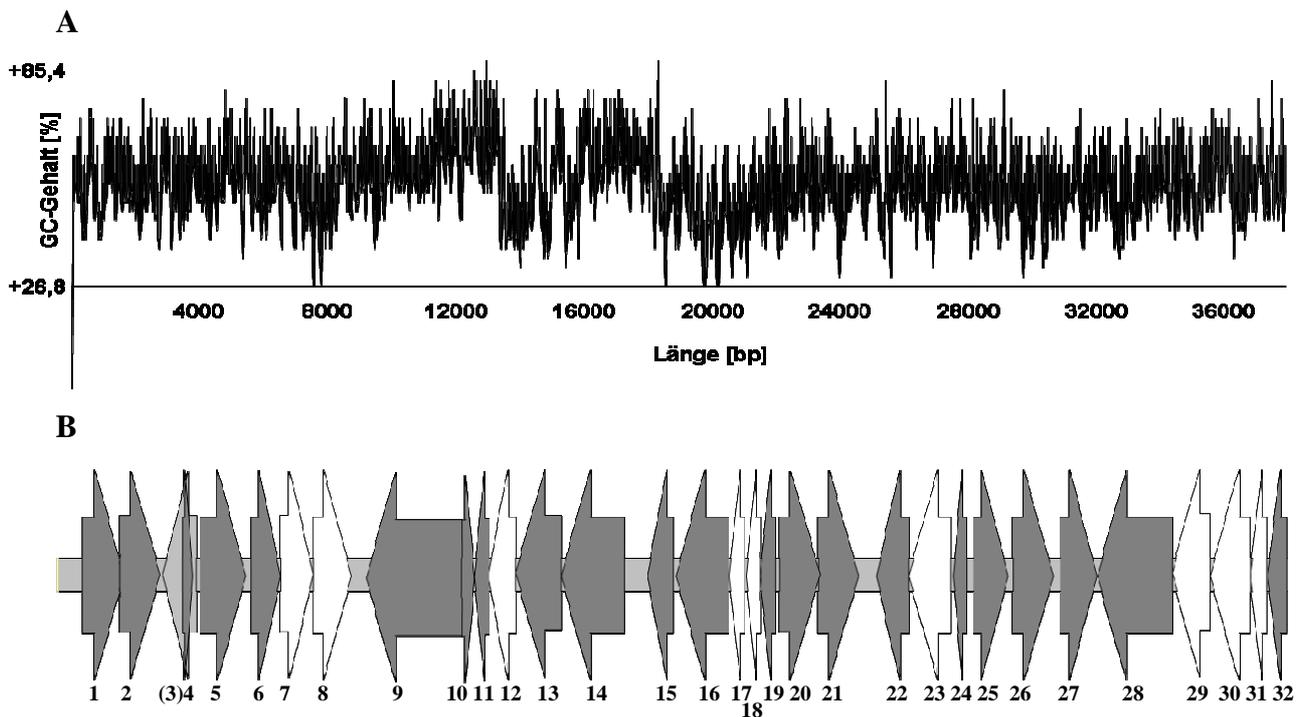


Abbildung 4-21: Darstellung des GC-Gehalts über das gesamte Fragment des Metagenomklons 8N3 (A). Physikalische Genkarte des Metagenomklons 8N3 zur Darstellung der identifizierten ORFs sowie deren Orientierung (B), ORFs mit zugeordneter Funktion sind grau, hypothetische Proteine sind weiß dargestellt.

Tabelle 4-8: ‚Open reading frames‘ (ORFs) des genomischen Fragments 8N3; Nummerierung aus Abb. 4-21 B und Lokalisation auf dem Fragment, Größe [aa]: entsprechende Größe des kodierten Proteins [Aminosäuren]; hypothetisches Genprodukt: erster ‚Blast-Hit‘ nach ‚BlastX‘-Analyse, Positive/ Homologie [%]: Identitäts-, Ähnlichkeitswerte. Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

ORF	Lokus	Größe [aa]	Genprodukt	Organismus	Positive/ Homologie [%]
1	736- 2046	437	Acetylornithin- deacetylase	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	197/386 (51%)
2	1928- 3190	412	5-Exo-Alkohol Dehydrogenase	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	220/362 (60%)
(3)	3281- 4345	355	Alkanal-Monooxygenase	<i>Frankia alni</i> ACN14a	217/349 (62%)
4	3887- 4228	114	Luziferase-ähnlich	<i>Frankia</i> sp. CcI3	81/114 (71%)
5	4456- 5904	483	MFS_1 (Major facilitator superfamily)	<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	219/422 (51%)

ORF	Lokus	Größe [aa]	Genprodukt	Organismus	Positive/ Homologie [%]
6	6085-6969	295	Hybrid-Transferase 1	<i>Rhodococcus opacus</i>	155/260 (59%)
7	7014-8030	339	hypothetisches Protein	-	-
8	8023-9228	402	hypothetisches Protein	-	-
9	9701-12703	110	Type I-Restriktions- Modifikation-System spezifische Untereinheit	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	842/998 (84%)
10	12703-13131	143	PilT-like Protein	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	75/137 (54%)
11	13134-13577	146	putativer ABC-Transporter	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	8/109 (44%)
12	13559-14416	286	hypothetisches Protein	-	-
13	14428-15864	479	Type I-Restriktions- Modifikation-System spezifische Untereinheit	<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	314/463 (67%)
14	15864-17846	661	Type I-Restriktions- Modifikation-System spezifische Untereinheit	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	532/712 (74%)
15	18589-19389	267	Alpha/Beta-Hydrolase	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	130/264 (49%)
16	19485-21140	553	Fettsäureketten-CoA Ligase	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	431/549 (78%)
17	21170-21637		hypothetisches Protein	-	-
18	21700-22134		hypothetisches Protein	-	-
19	22148-22600	152	Permease	<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	69/135 (51%)
20	22752-24035	428	MFS (Major facilitator superfamily)-Transporter	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	213/413 (51%)
21	23995-25245	417	putatives Fosmidomycin Resistenzprotein	<i>Carboxydotherrnus</i> <i>hydrogenoformans</i> Z-2901	204/335 (60%)
22	25811-26836	342	2-Hydroxyazid Dehydrogenase	Alphaproteobakterium BAL199	196/301 (65%)
23	26843-28147	435	hypothetisches Protein	-	-
24	28242-28649	136	Carboxymukonolakton- decarboxylase	<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	70/108 (64%)
25	28869-29957	363	Alpha-Kette-Alkanal- Monooxygenase	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	181/364 (49%)
26	30127-31398	424	Aryldialkylphosphatase- verwandtes Protein	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	242/405 (59%)
27	31626-32753	376	Amidohydrolase	<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56'	188/392 (47%)
28	32786-35167	794	CAIB/BAIF Familie (Energieproduktion)	uncultured marine bacterium Ant4E12	362/814 (44%)
29	35167-36342	392	hypothetisches Protein	-	-
30	36346-37611	422	hypothetisches Protein	-	-
31	37622-38119	166	hypothetisches Protein	-	-
32	38140-38760	207	Malonamidase E2	<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	89/178 (50%)

Fortsetzung Tabelle 4-8.

Obwohl die Klone 4L5 und 8N3 mittels PCR mehrfach positiv auf das Vorhandensein des *Nitrosospira-amoA*-Gens getestet wurden und dies auch durch Sequenzierungen verifiziert wurde, zeigte auf beiden Klonen keiner der identifizierten ORFs Homologien zu *amoA*-Datenbankeinträgen. Um weiterhin zu testen, ob das *amoA*-Gen, bzw. das gesamte AMO-Operon möglicherweise in das Wirtsgenom integriert und deshalb nicht auf dem Insert zu finden war, wurde eine Southern Blot-Analyse des Metagenomklons 8N3 durchgeführt (Punkt 4.3.4).

4.3.4 Southern-Blot-Analyse des Klons 8N3

Die Fosmid- und die Gesamt-DNA zweier ausgewählter Einzelkolonien des Metagenomklons 8N3 wurden mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Beide Klone trugen das gleiche genomische Fragment als Insert, was an den gleichen Restriktionsmustern erkennbar war (Abb. 4-22).

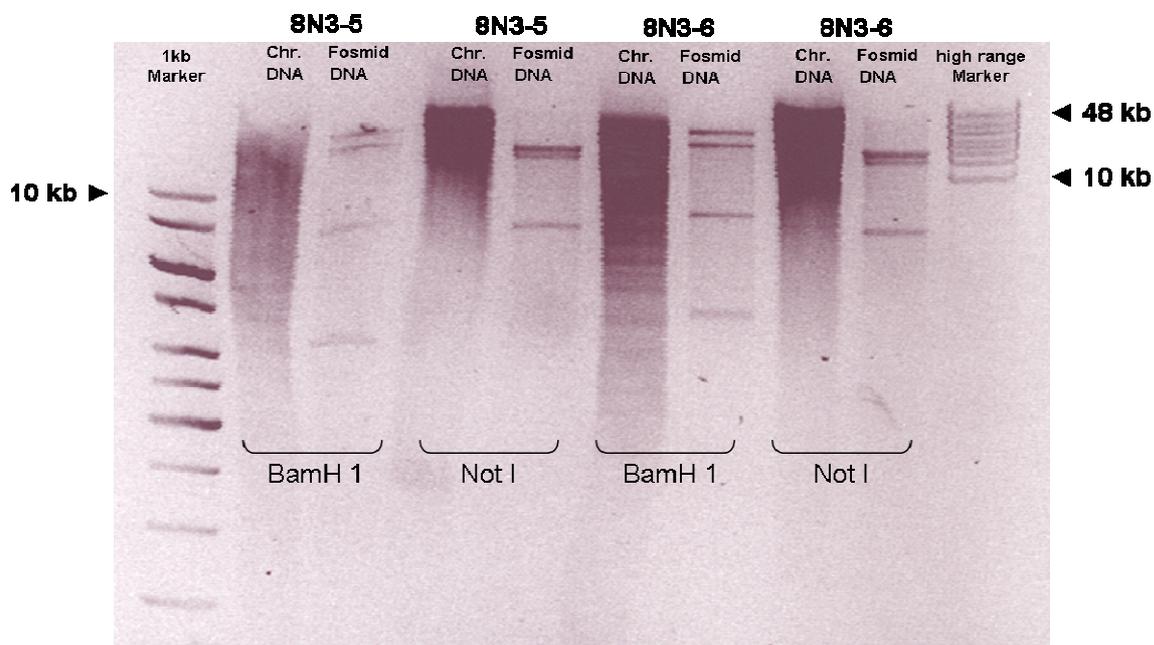


Abbildung 4-22: Restriktionsverdau von Fosmid- und Gesamt-DNAs der Klone 8N3-5 und 8N3-6 jeweils mit *BamH1* und *NotI* verdaut.

Nach der Übertragung der Restriktionsfragmente auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer zu *Nitrosospira-amoA* homologen Sonde hybridisiert. Die beidseitig aufgetragenen

Positivkontrollen zeigten ein deutliches Signal. Die Spuren, in denen die *BamH1*-verdauten Gesamt-DNAs der jeweiligen Klone liefen, zeigten ebenfalls jeweils ein deutlich positives Signal (Abb. 4-23). Allerdings verlief die Hybridisierung der Membran für alle Fosmid-DNAs sowie die *NotI*-geschnittenen Gesamt-DNAs negativ.

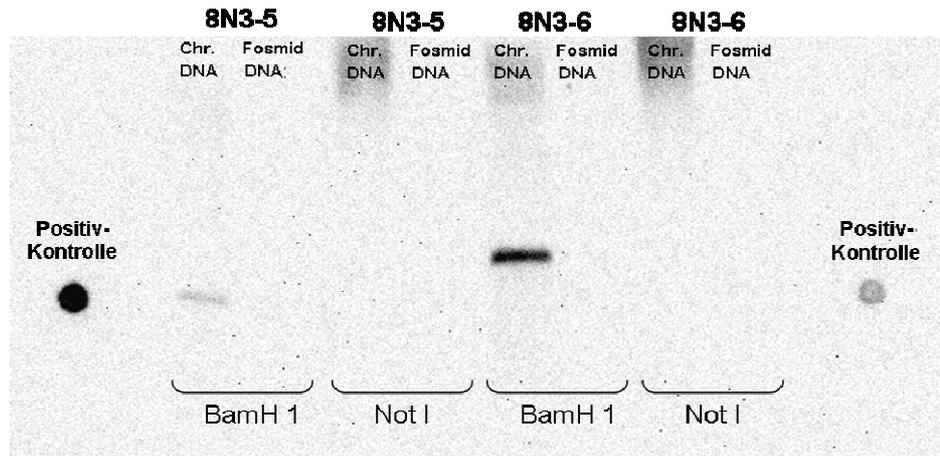


Abbildung 4-23: Southern-Blot von Fosmid- und Gesamt-DNAs der Klone 8N3-5 und 8N3-6 jeweils mit *BamH1* und *NotI* verdaut, hybridisiert mit *Nitrosospira-amoA*-spezifischen Sonde. Positivkontrolle war ein *Nitrosospira-amoA*-tragendes Plasmid.

4.3.5 Annotation des Crenarchaea-*amoA*-positiven Klons 58F6

Die Genomsequenz des Klons 58F6 umfasst 43296 bp mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 40,1 % (Abb. 4-24 A). Insgesamt wurden 54 ‚open reading frames‘ (ORFs) identifiziert, von denen 25 ‚hypothetische Proteine‘ darstellen (Abb. 4-24 B). Eine Zusammenstellung der ORFs inklusive hypothetischer Funktion befindet sich in Tabelle 4-9.

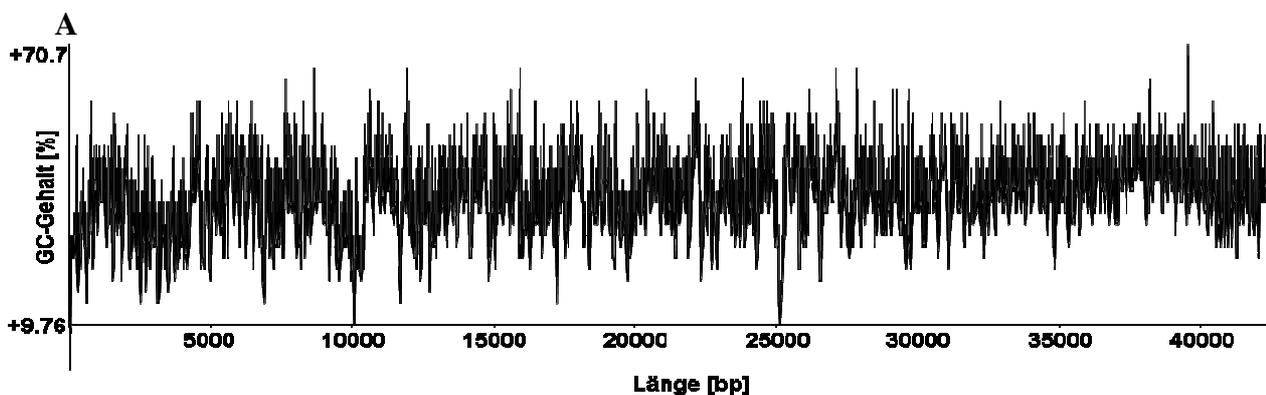


Abbildung 4-24 A: Darstellung des GC-Gehalts über das gesamte Fragment des Metagenomklons 58F6.

B

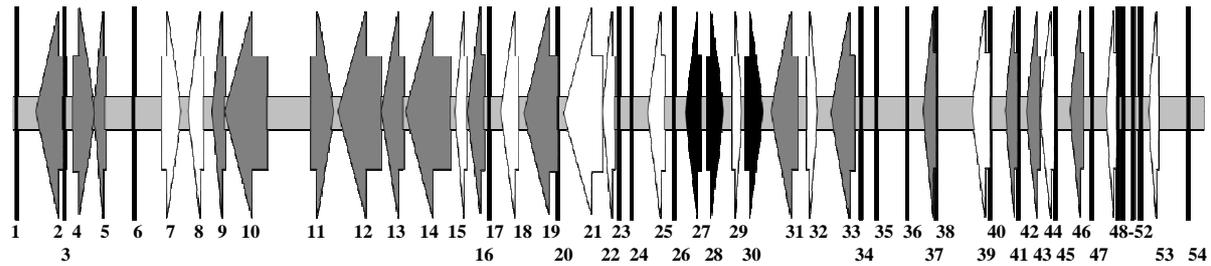


Abbildung 4-24 B: Physikalische Genkarte des Metagenomklons 8N3 zur Darstellung der identifizierten ORFs sowie deren Orientierung (B), ORFs mit zugeordneter Funktion sind grau, hypothetische Proteine sind weiß, die Gene *amoB* (27), *amoC* (28) und *amoA* (30) sind schwarz dargestellt.

Tabelle 4-9: ‚Open reading frames‘ (ORFs) des genomischen Fragments 8N3; Nummerierung aus Abb. 4-24 B und Lokalisation auf dem Fragment, Größe [aa]: entsprechende Größe des kodierten Proteins [Aminosäuren]; hypothetisches Genprodukt: erster ‚Blast-Hit‘ nach ‚BlastX‘-Analyse, Positive/ Homologie [%]: Identitäts-, Ähnlichkeitswerte. Fortsetzung der Tabelle auf den nächsten Seiten.

ORF	Lokus	Größe [aa]	Genprodukt	Organismus	Positive/Homologie [%]
1	21-332	104	hypothetisches Protein	-	-
2	722-1816	365	Transposase Familie Protein	<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Drosophila ananassae</i>	114/253 (45%)
3	1756-2067	104	hypothetisches Protein	-	-
4	2089-2874	262	DNA-Methyltransferase	<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	189/252 (75%)
5	2863-3267	135	TATA-box bindendes Protein	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	186/187 (99%)
6	4281-4622	114	Stickstoff regulierendes Protein P-II	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	93/113 (82%)
7	5332-6018	229	hypothetisches Protein Nmar_1522	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	153/237 (64%)
8	6274-6837	188	hypothetisches Protein DUF437	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	122/151 (80%)
9	7159-7614	152	Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängiges Protein Untereinheit	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	424/517 (82%)
10	7618-9162	515	Scal Restriktion Endonuklease	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	98/133 (73%)
11	10766-11593	276	Transposase	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	135/268 (50%)
12	11762-13324	521	von Willebrand Faktor Type A	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	476/519 (91%)
13	13325-14119	265	ATPase	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	235/262 (89%)
14	14212-15852	547	Geranylreduktase	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	437/483 (90%)
15	16027-16452	142	hypothetisches Protein DUF54	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	88/140 (62%)
16	16459-17070	204	ribosomales Protein S3Ae	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	187/203 (92%)
17	17241-17576	112	putatives RTX-Familien-Exoprotein	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	40/75 (53%)

ORF	Lokus	Größe [aa]	Genprodukt	Organismus	Positive/Homologie [%]
18	17664-18362	233	hypothetisches Protein	-	-
19	18512-19771	421	Seryl-tRNA-Synthetase	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	368/421 (87%)
20	19774-20013	80	hypothetisches Protein Nmar_1510	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	69/80 (86%)
21	19979-21397	473	Phosphoesterase DHHA1	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	417/467 (89%)
22	21398-21843	149	Ribosomales S13S15 Domain-Protein	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	131/148 (88%)
23	21993-22322	110	hypothetisches Protein Nmar_1504	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	91/102 (89%)
24	22429-22704	92	hypothetisches Protein Nmar_1506	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	88/89 (98%)
25	23058-23639	194	hypothetisches Protein CENSYa_0392	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	135/178 (75%)
26	24011-24340	110	hypothetisches Protein Nmar_1504	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	91/102 (89%)
27	24407-24976	190	Ammonia-Monooxygenase Untereinheit B	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	177/189 (93%)
28	25191-25779	203	Ammonia-Monooxygenase Untereinheit C	nicht-kultivierter Crenarchaeot	189/193 (97%)
29	26113-26475	121	hypothetisches Protein	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	104/119 (87%)
30	26583-27230	216	Ammonia-Monooxygenase Untereinheit A	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	210/216 (97%)
31	27512-28501	330	putativer Transkriptions- Regulator	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	224/292 (76%)
32	28843-29229	129	hypothetisches Protein Nmar_1498	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	122/125 (97%)
33	29721-30584	288	DNA-Adenine-Methylase	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	235/275 (85%)
34	30797-31057	87	hypothetisches Protein	-	-
35	31360-31620	87	hypothetisches Protein	-	-
36	32517-32774	86	hypothetisches Protein	-	-
37	33072-33557	162	PKD (Protein-Kinase D) Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3- 1	89/143 (62%)
38	33576-33821	82	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3- 1	63/82 (76%)
39	34848-35486	213	hypothetisches Protein	<i>Flavobacteria bacterium</i> BBFL7	151/206 (73%)
40	35496-35753	86	hypothetische Proteine	-	-
41	36051-36536	162	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3- 1	90/143 (62%)
42	36555-36800	82	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3- 1	63/82 (76%)
43	36849-37334	162	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3- 1	89/143 (62%)
44	37353-37865	171	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3- 1	80/105 (76%)

Fortsetzung Tabelle 4-9.

ORF	Lokus	Größe [aa]	Genprodukt	Organismus	Positive/Homologie [%]
45	37914-38255	114	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	60/86 (69%)
46	38448-38933	162	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	93/147 (63%)
47	39255-39605	117	PKD Domain-Protein	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	56/87 (64%)
48	39738-40115	126	hypothetisches Protein	-	-
49	40173-40343	57	hypothetisches Protein Nmar_1650	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	38/52 (73%)
50	40371-40688	106	hypothetisches Protein Nmar_0456	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	46/96 (47%)
51	40716-40997	94	hypothetisches Protein Nmar_0456	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	42/90 (46%)
52	41004-41264	87	hypothetisches Protein	-	-
53	41277-41678	134	hypothetisches Protein	-	-
54	42738-43040	101	hypothetisches Protein	-	-

Fortsetzung Tabelle 4-9.

Das Insert des Klons 58F6 enthält das komplette Operon, welches das Schlüsselenzym der Ammoniak-Oxidation, die Ammoniak-Monooxygenase, kodiert. Das Operon ist 2827 bp lang und enthält neben den drei Untereinheiten (*amoB*, *amoC* und *amoA*) ein konserviertes ‚hypothetisches Protein‘. Die höchsten Homologien haben die Gene zu AMO-Genen aus dem marinen *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* und dem Schwamm-assoziierten *Cenarchaeum symbiosum* (93-98%).

5 Diskussion

5.1 Die Physiologie der mikrobiellen Nitrifikation in marinen Schwämmen

Ammonium- und Nitrat Ausscheidung

Schwämme filtrieren Nahrungspartikel aus dem den Schwammkörper durchfließenden Meerwasser, verdauen diese im Mesohyl und decken damit den Großteil ihres Energiebedarfs (Reisig 1971, Pile 1997, Ribes *et al.* 1999, Wehrl *et al.* 2007, Jiménez und Ribes 2007). Durch die interne Prozessierung der herausgefilterten Nahrungspartikel entstehen große Mengen an Ammonium als Stoffwechselendprodukt welches von Schwämmen durch einfache Diffusionsprozesse wieder ausgeschieden wird (Brusca und Brusca 1990). Im Gegensatz zu anderen marinen Habitaten wie Meerwasser oder Sediment, in denen Stickstoff ein limitierter Faktor ist (Capone 2000), stellen Schwämme ein vergleichsweise reichhaltiges Ammonium-reservoir für potentielle Symbionten dar. In dieser Dissertationsarbeit wurde gezeigt, dass Ammonium von allen getesteten Schwammarten ausgeschieden wird. Dabei schienen große saisonale Unterschiede in der Ammoniumexkretion sowohl bei bakterienhaltigen als auch bei bakterienfreien Schwammarten vorzuherrschen. Diese jahreszeitlich bedingten Schwankungen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig dokumentiert und sind das Ergebnis von Freilandarbeiten über mehrere Jahre.

Einige Studien berichteten zusätzlich zur Exkretion von Ammonium auch von einer Nitrat- oder Nitrat Ausscheidung in marinen Schwämmen (Corredor *et al.* 1988, Diaz und Ward 1997, Bayer K. 2004, Jiménez und Ribes 2007, Bayer *et al.* 2007, 2008, Southwell *et al.* 2008). Interessanterweise wurden in der Vergangenheit hauptsächlich bakterienhaltige (HMA) Schwämme positiv auf die Exkretion von Nitrat getestet. Corredor und Kollegen (1988) schrieben als erste diese Nitrat Ausscheidung der Aktivität nitrifizierender Bakterien zu. Auch in dieser Dissertationsarbeit konnte für die bakterienhaltigen Schwammarten *A. aerophoba* und *C. reniformis* die Exkretion von Nitrat nachgewiesen werden (Tab. 5-1). Diese potentiellen Nitrifikationsraten sind mit denen vergleichbar, die in der Vergangenheit in marinen bakterienhaltigen Schwämmen gemessen wurden und lagen deutlich über den Raten in Sediment oder Meerwasser (Tab. 5-1). Ähnlich hohe Nitrifikationsraten wurden teilweise auch in anderen marinen Invertebraten gemessen (Tab 5-1). Welsh und Castadelli (2004)

postulierten, dass die Organismen der Makrofauna als Substrat für nitrifizierende Mikroorganismen dienen. Ähnlich wie bei Schwämmen scheinen diese mikrobiellen Nitrifizierer von den Stoffwechsellendprodukten ihrer tierischen Wirte zu profitieren. Die sehr hohen Nitrifikationsraten können bis zu 62,6 % der gesamten lokalen Nitrifikationsrate ausmachen und spielen so eine entscheidende Rolle im Stickstoffbudget des italienischen Podeltas (Welsh und Castadelli 2004).

Tabelle 5-1: Zusammenfassung von Nitratexkretionsraten in bakterienhaltigen und -armen Schwämmen aus dieser Arbeit und aus der Literatur im Vergleich mit anderen Umweltraten in [nmol/g⁻¹ Trockengewicht h⁻¹] wenn nicht anders angegeben.

	Organismus/Habitat	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ - Ausscheidung	Referenz
bakterienhaltige Schwämme (HMA)	<i>Agelas oroides</i>	360	Jiménez und Ribes 2007
	<i>Aplysina aerophoba</i>	bis 830 ¹ 780	Bayer K. 2004, Bayer <i>et al.</i> 2007, Bayer <i>et al.</i> 2008 Jiménez und Ribes 2007
	<i>Chondrilla nucula</i>	428 - 620 1023 - 2650	Corredor <i>et al.</i> 1988 Diaz und Ward 1997
	<i>Chondrosia reniformis</i>	bis 510 ¹ 720	diese Arbeit, Bayer <i>et al.</i> 2007 Jiménez und Ribes 2007
	<i>Ircinia oros</i>	240	Jiménez und Ribes, 2007
	<i>Oligoceras violacea</i>	30 - 1030 ³	Diaz und Ward, 1997
	<i>Plakortis halochondroides</i>	320	Diaz und Ward, 1997
bakterienarme Schwämme (LMA)	<i>Anthosigmella varians</i> (umbenannt in <i>Cliona varians</i>) ²	1,45 - 18,9	Corredor <i>et al.</i> 1988
	<i>Aphrocallistes vastus</i>	n. n.	Yahel <i>et al.</i> 2007
	<i>Axinella polypoides</i>	180	Jiménez und Ribes 2007
	<i>Dysidea avara</i>	n. n.	diese Arbeit, Bayer <i>et al.</i> 2007 Jiménez und Ribes 2007
	<i>Tethya</i> sp.	n. n.	diese Arbeit, Bayer <i>et al.</i> 2007
	<i>Pseudaxinella zeai</i> (umbenannt in <i>Svenzea zeai</i>) ²	390 - 580	Diaz und Ward 1997
	<i>Rhabdocalypus dawsoni</i> ³	n. n.	Yahel <i>et al.</i> 2007
Umwelt	Sediment	0,02 - 7,7	Bernhard <i>et al.</i> 2007
	Riff Sand	0 - 2	Corredor und Capone 1985
	Oberflächenwasser (Ozean)	1,1 - 3,1 (3,3 - 5,7 x 10 ⁸ Zellen/ l)	O'Mullan und Ward 2005
	marine Makrofauna ⁴	3 - 1020	Welsh und Castadelli 2004

¹ Raten waren saisonal variabel; ² Quelle: World Porifera Database: Rob van Soest, Nicole Boury-Esnault, Dorte Janussen und John Hooper (2005), URL: <http://www.marinespecies.org/porifera/>; ³ Nitritauscheidung; n.n.: nicht nachweisbar. ⁴ marine Makrofauna [*T. philippinarum* (Muschel), *M. galloprovincialis* (Muschel), *N. succinea* (Borstenwurm), *P. elegans* (Garnele), *Gammarus* spp. (Flohkrebs), *C. aestuari* (Küstenkrabbe), *C. insidiosum* (Flohkrebs), *C. neritea* (Schnecke)]

Nitrit wurde in den Lebenschwamm-Experimenten nie ausgeschieden, was darauf schließen lässt, dass das produzierte Nitrit sofort von Nitrit-oxidierenden Bakterien weiteroxidiert wird. Einzige Ausnahme ist der Schwamm *Oligoceras violacea*, bei dem eine Nitrit- aber keine Nitratausscheidung dokumentiert wurde (Diaz und Ward 1997). Für diese Art wurde eine Entkopplung der Nitrit-Oxidation diskutiert, die dann in einer Nitrit- statt einer Nitratrekretion resultieren kann (Diaz und Ward 1997).

Im Gegensatz zu bakterienhaltigen Schwammarten zeigten die hier getesteten bakterienfreien Arten *D. avara* und *Tethya* sp. erwartungsgemäß keine Nitratausscheidung (Tab. 5-1, Bayer *et al.* 2007). Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen in anderen ‚low-microbial-abundance‘ (LMA)-Schwämmen aus vergangenen Studien (Tab. 5-1). Jiménez und Ribes (2007) konnten für *D. avara* ebenfalls keine Nitratrekretion nachweisen. Yahel *et al.* (2007) untersuchten in einer Studie zwei Glasschwamm-Arten und auch hier konnte keine Nitratausscheidung nachgewiesen werden (Yahel *et al.* 2007). Das Fehlen von Nitrat als Exkretionsprodukt geht auch in diesen Fällen mit dem bakterienfreien Mesohyl der Schwämme einher (persönliche Mitteilung von G. Yahel, Ruppin Academic Center, Michmoret, Israel). Auch das Mesohyl von *C. varians*-Schwämmen weist nur geringe Mengen Bakterien auf (persönliche Mitteilung von K. Rützler, Smithsonian Institution, Washington, USA) und auch hier konnte eine nur sehr geringe Nitratausscheidung in Inkubationsexperimenten nachgewiesen werden (Corredor *et al.* 1988, Tab. 5-1).

Saisonale Variabilität

A. aerophoba zeigte eine große saisonale Variabilität in der Ammoniumausscheidung. Während im April kein Ammonium ausgeschieden wurde, stiegen die Exkretionsraten zum Spätsommer hin stetig an (Abb. 5-1, Bayer *et al.* 2008). Diese saisonale Variabilität zeigte auch *C. reniformis* sowie der untersuchte bakterienfreie Schwamm *Tethya* sp., was die Annahme unterstützt, dass Ammonium vom Schwamm selbst ausgeschieden wird. Interessanterweise korreliert der jahreszeitliche Anstieg der Ammoniumexkretion mit einem Anstieg der Wassertemperaturen im Mittelmeer. Die Temperatur ist ein entscheidender Faktor, der die Stoffwechselaktivität bei Schwämmen positiv beeinflussen kann (Frost 1978). Ein geringerer Stoffwechsel in kälteren Jahreszeiten würde folglich zu einer verminderten Ammoniumexkretion führen. Die höchste Ammoniumausscheidung von *A. aerophoba* wurde im September gemessen. Die Rate war ca. doppelt so hoch wie im August, die Wassertemperatur sank im Vergleich allerdings wieder um durchschnittlich 4°C (Abb. 5-1, Bayer *et al.*

2008). Der saisonale Temperaturanstieg kann somit nicht der alleinige Grund für die steigenden Ammoniumexkretionsraten sein.

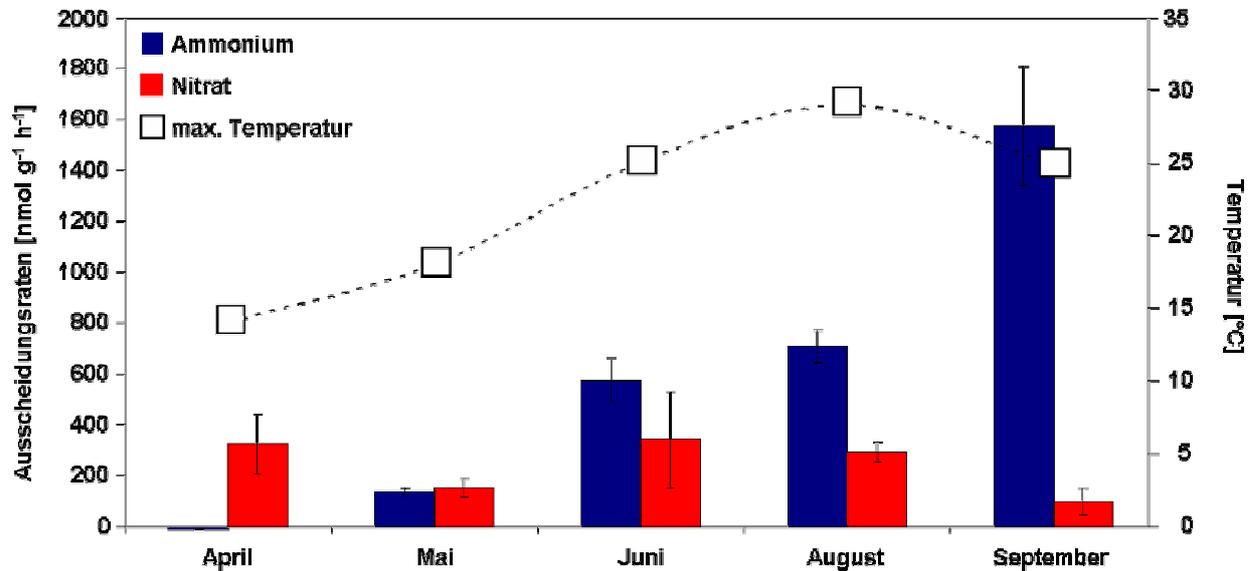


Abbildung 5-1: Graphische Zusammenfassung der saisonabhängigen Ammonium- und Nitratausscheidungsraten in *Aplysina aerophoba* (jeweils $n=3 \pm \text{SEM}$) und der jeweils vorherrschenden Maximaltemperaturen im Mittelmeer.

Neben der Temperatur gelten Variablen wie das Nahrungsangebot, die Schwammgröße und die Sauerstoffkonzentration als hauptsächliche Faktoren, die die Exkretionsraten in Schwämmen beeinflussen können (z.B. Frost 1987). Bezüglich der Schwammgröße konnte allerdings kein Zusammenhang mit den Ammoniumexkretionsraten erkannt werden. Wie die Temperatur kann auch das Nahrungsangebot saisonal variieren und somit einen großen Einfluss auf den Schwamm-Metabolismus haben. Ribes *et al.* (1999) zeigten, dass die Konzentrationen der unterschiedlichen Nahrungspartikel im Mittelmeer zumindest teilweise jahreszeitliche Unterschiede aufwiesen. Ein eingeschränktes Nahrungsangebot in den Wintermonaten könnte zu einem geringeren Stoffwechsel und somit zu einer geringeren Ammoniumausscheidung führen, während mit steigenden Temperaturen im Sommer auch das Nahrungsangebot vielseitiger und reichhaltiger sein könnte.

Die Nitratexkretion scheint dagegen mit Ausnahme der Rate im September saisonal konstant zu bleiben (Bayer *et al.* 2008). Allerdings waren die Nitratexkretionsraten individuell teilweise sehr unterschiedlich, was durch die großen Standardfehler sichtbar wird (Abb. 5-1,

Juni). Diese Unterschiede standen nicht mit der Schwammgröße in Beziehung. Die Nitrifikation kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden, u. a. auch durch die Temperatur (Berounsky und Nixon 1993). Auch in Sediment aus salzigen Sümpfen waren die Nitrifikationsraten im Sommer potenziell höher als im Winter (Dollhopf *et al.* 2005). Diese Ergebnisse widersprechen denen aus dieser Dissertationsarbeit, in der die höchsten Nitrifikationsraten bei der niedrigsten Temperatur im Frühjahr gemessen wurden (Abb. 5-1). Auch bei einer anderen Untersuchung von Sediment, welches von drei unterschiedlichen Standorten einer kalifornischen Flussmündung stammte, wurden die höchsten Nitrifikationsraten im späten Sommer gefunden. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Temperaturen am höchsten. Aber in der gleichen Studie wurde eine ebenfalls hohe Nitrifikationsrate im späten Winter beobachtet als die Temperaturen nur zwischen 10 und 15 °C lagen (Caffrey *et al.* 2003). Auch die Salinität (Jones und Hood 1980, Bernhard *et al.* 2007), die Ammoniumkonzentration (Jones und Hood 1980, Magalhães *et al.* 2005) oder die Anwesenheit anderer, z.B. denitrifizierender Mikroorganismen (Thompson *et al.* 1995, Usui *et al.* 2001) können die Nitrifikation beeinflussen. Da die während der Experimente vorherrschende Salinität nicht aufgezeichnet wurde, kann über einen eventuellen Einfluss des Salzgehalts an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden. Es ist aber davon auszugehen, dass die Salinität im Mittelmeer in einem jahreszeitlichen Zyklus eher konstant ist. Die Ammoniumkonzentration scheint dagegen einen negativen Einfluss auf die potentielle Nitrifikationsrate zu haben (Abb. 5-1). Im September wurde mit Abstand die höchste Ammoniumexkretion gemessen, während die Nitrat Ausscheidung hingegen die niedrigste war. Es ist bekannt, dass zu hohe Ammoniumkonzentrationen die Aktivität von Nitrifizierern inhibieren können (Jones und Hood 1980, Magalhães *et al.* 2005). Obwohl das durch den Schwamm produzierte Ammonium offensichtlich schnell aus dem Schwamm diffundieren kann, könnten im Schwamminneren höhere und somit hemmende Ammoniumkonzentrationen vorliegen. Eine Konzentrationsmessung des Ammoniums direkt im Schwamminneren könnte über eine eventuell hemmende Wirkung Aufschluss geben, ist aber aufgrund methodischer Limitationen nur sehr schwer umzusetzen.

Ein Einfluss der Dauer der Schwammhälterung in Meerwasserhälterungsbecken vor Versuchsbeginn wurde überprüft, um die Versuchsparameter zu definieren. Während die Ammoniumexkretionsraten mit zunehmender Hälterungsdauer sichtbar aber statistisch nicht signifikant anstiegen, blieben die Nitratexkretionsraten dagegen unabhängig von der Hälterungsdauer konstant (Bayer *et al.* 2007). Allerdings zeigten sich großen Schwankungen

vor allem bei den Nitratexkretionsraten jedes einzelnen Individuums nach 11 Tagen Hälterung, welche u. a. durch eine zu geringe Stichprobengröße zu erklären ist. Eine Verwendung der Schwämme in Inkubationsexperimenten maximal 2 Tage nach Sammlung erschien somit sinnvoll.

Hemmung durch Inhibitor

Nitrapyrin ist ein spezifischer Hemmstoff der Nitrifikation und wurde in der Vergangenheit erfolgreich vor allem in der Landwirtschaft zur Verhinderung eines Stickstoffverlusts eingesetzt (Belser und Schmidt 1981). Die inhibierende Wirkung ist den chelatbildenden Eigenschaften des Hemmstoffs zuzuschreiben, die das aktive, Kupferhaltige Zentrum der Ammoniak-Monooxygenase blockiert (Campbell und Aleen 1965, Goring 1962). Auch in marinen Invertebraten wie Korallen (Wafar *et al.* 1990) und erst kürzlich auch Schwämmen (Southwell *et al.* 2008) fand Nitrapyrin als Inhibitor der mikrobiellen Nitrifikation Verwendung. In der vorliegenden Arbeit konnte die Nitratexkretion bei *A. aerophoba* vollständig durch Zugabe von Nitrapyrin inhibiert werden (Bayer *et al.* 2008). Da sich die Nitratexkretionsraten nach 4,5-tägiger Hälterung der Schwämme in frischem Meerwasser vollständig erholt hatten, kann davon ausgegangen werden, dass Nitrapyrin nicht toxisch ist. Mit diesem Versuch konnte erstmalig bewiesen werden, dass die Nitrat Ausscheidung des Schwammes tatsächlich mikrobiellen Ursprungs ist (Bayer *et al.* 2008).

Einfluss der Pumpaktivität auf Ammonium- und Nitratexkretion

Interessanterweise scheint die Nitratexkretion mit der Pumpaktivität der Schwämme zu korrelieren. So konnte ich bereits in meiner Diplomarbeit zeigen, dass nicht pumpende *A. aerophoba* auch kein Nitrat ausschieden, während Ammonium mit nahezu doppelten Raten ausgeschieden wurde (Bayer K. 2004). Ich stellte damals die Hypothese auf, dass mit dem Stoppen der Pumpaktivität die Sauerstoffkonzentration im Mesohyl abnimmt und somit die Nitrifikation gehemmt würde. In einer sich anschließenden Studie konnte ich gemeinsam mit F. Hoffmann (MPI Bremen) und weiteren Kollegen durch die Verwendung von Mikroelektroden zur *in-situ* Messung der Sauerstoffkonzentration zeigen, dass das Mesohyl von aktiv pumpenden *A. aerophoba* wie auch das Umgebungswasser nahezu sauerstoffgesättigt ist (Dreiecke in Abb. 5-2, Hoffmann *et al.* 2008). Wenn ein Individuum die Pumpaktivität stoppt, wird das Schwamminnere innerhalb von 15 min anoxisch (Hoffmann *et al.* 2008). Der Schwamm scheint folglich in der Lage zu sein, die Sauerstoffkonzentration im Mesohyl und damit auch die Nitrifikation selbst zu regeln. Wenn ein Schwamm aktiv pumpt, kann die

aerob ablaufende Nitrifikation stattfinden, während sie vermutlich in nicht-pumpaktiven Schwämmen aufgrund des mangelnden Sauerstoffs gehemmt wird.

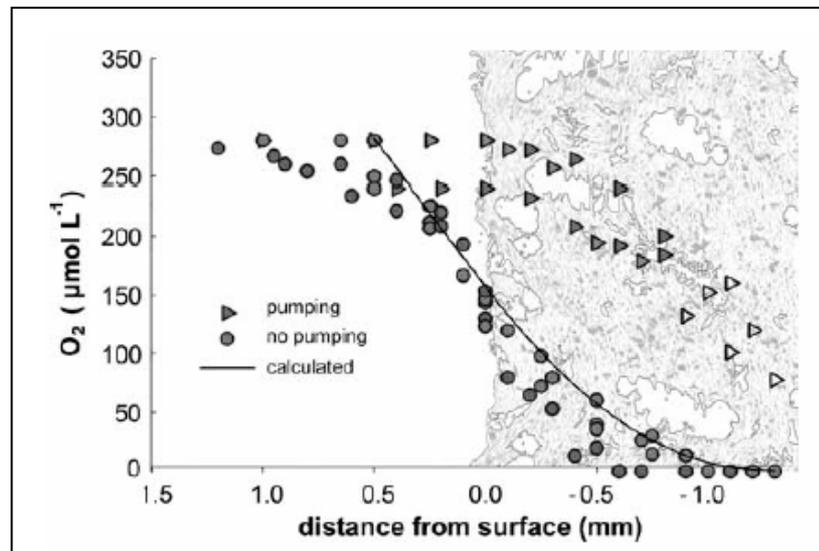


Abbildung 5-2: Sauerstoffmessung im Mesohyl von *A. aerophoba* mittels Mikroelektroden. Die Dreiecke geben dabei die Sauerstoffmessungen in einem aktiv pumpenden Schwamm, die Kreise in einem inaktivem Zustand an (aus Hoffmann *et al.* 2008).

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, versuchte ich, Schwämme durch die Zugabe des Hemmstoffs Nikotin in ihrer Pumpaktivität zu hemmen (Simpson 1984). Mit der Reduktion der Pumpaktivität wurde die Nitratexkretion fast vollständig inhibiert und die Ammoniumausscheidung sank auf nahezu 50 %, was vermutlich eher auf eine generelle toxische Wirkung des Nikotins auf den Schwamm hinweist. Die Hemmung der Pumpaktivität in Schwämmen durch Zugabe von Nikotin erwies sich somit als ungeeignet für Untersuchungen an lebenden Schwämmen. Durch das mechanische Verschließen der Ausstromöffnungen von Schwämmen mit Hilfe von Zahnstochern konnte die Nitratexkretion verhindert werden, während die Ammoniumexkretion nicht beeinflusst wurde. Zusätzlich schien ein solcher Eingriff keine größeren Verletzungen um die Oscula herum zu hinterlassen, sodass diese unkonventionelle Methode für zukünftige Experimente an lebenden Schwämmen zu verwenden ist.

Stimulation der Nitrifikation durch Ammonium

Die Ammoniumaufnahme in *A. aerophoba* ist sowohl jahreszeitlich variabel als auch konzentrationsabhängig (Bayer *et al.* 2008). Im Frühjahr wurde Ammonium sehr rasch von den Schwämmen aufgenommen und es konnte eine bis zu vierfache Stimulation der

Nitratexkretion beobachtet werden (Abb. 5-3). Diese offensichtliche Stickstofflimitierung des Schwamms hängt vermutlich direkt mit dem geringeren Stoffwechsel der Schwämme und der daraus folgenden verminderten Ammoniumausscheidung des Schwamms zu dieser Jahreszeit zusammen. Im Gegensatz dazu wurde Ammonium im Sommer nicht aufgenommen und die Nitratexkretion wurde nicht stimuliert (Abb. 5-2). Allerdings wurden nur 30 μM Ammonium zugegeben, um die natürlich vorherrschenden Ammoniumkonzentrationen im Meerwasser zu simulieren (Capone 2000, Bayer *et al.* 2008). Ein konzentrationsabhängiger Effekt kann daher nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich sprechen die sehr viel höheren Ammoniumexkretionsraten im Sommer (Abb. 5-1) gegen eine Stickstofflimitierung.

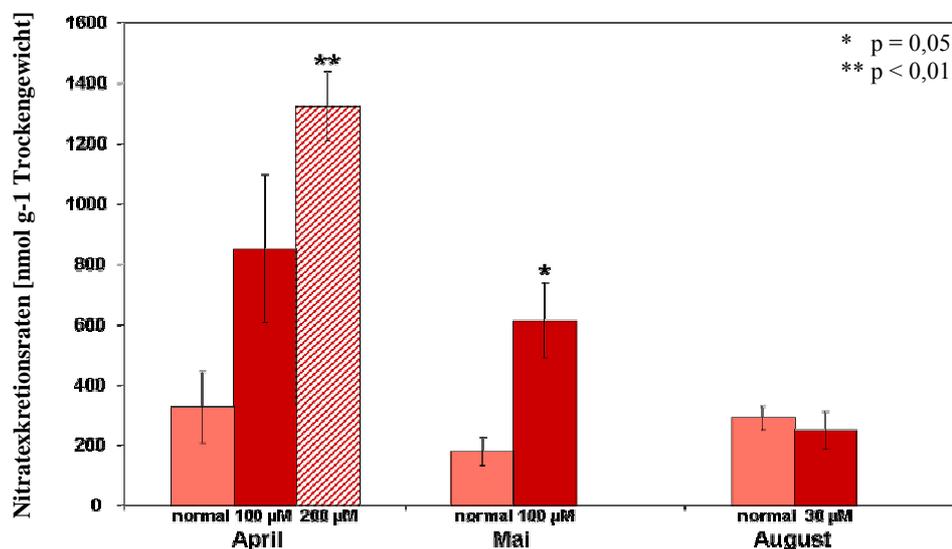


Abbildung 5-3: Zusammenfassung der Nitratexkretionsraten bei normaler Inkubation (hellrot) und bei Stimulation mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen (dunkelrot und schraffiert) in den Monaten April, Mai und August.

Die Abbildung 5-4 soll die Ergebnisse der Ammonium- und Nitratstoffwechselraten von *A. aerophoba* unter Betrachtung der Saisonalität schematisch zusammenfassen: Im Frühjahr scheiden die Schwämme wenig Ammonium aus und stellen somit eine ‚ammonium-sink‘ dar, was auch von der Tatsache unterstützt wird, dass zusätzliches Ammonium sehr rasch aufgenommen wurde (Abb. 5-4 A). Im Sommer dagegen stellen *A. aerophoba*-Schwämme eine ‚ammonium-source‘ dar, was durch die hohen Ammoniumexkretionsraten dargestellt ist sowie durch die Tatsache, dass zusätzliches Ammonium nicht aufgenommen wird (Abb. 5-4 B). Bei der sehr dichten Besiedlung tropischer Riffe mit Schwämmen (Diaz und Rützler 2001) haben diese somit einen erheblichen Anteil beim Recycling von anorganischem Stickstoff (Diaz und Ward 1997). Im Mittelmeer könnte *A. aerophoba* ebenso wie andere

bakterienhaltige Schwämme eine ähnlich wichtige Rolle im marinen Stickstoffkreislauf spielen, indem sie das durch die mikrobielle Nitrifikation entstandene Nitrat anderen Organismen zur Verfügung stellen.

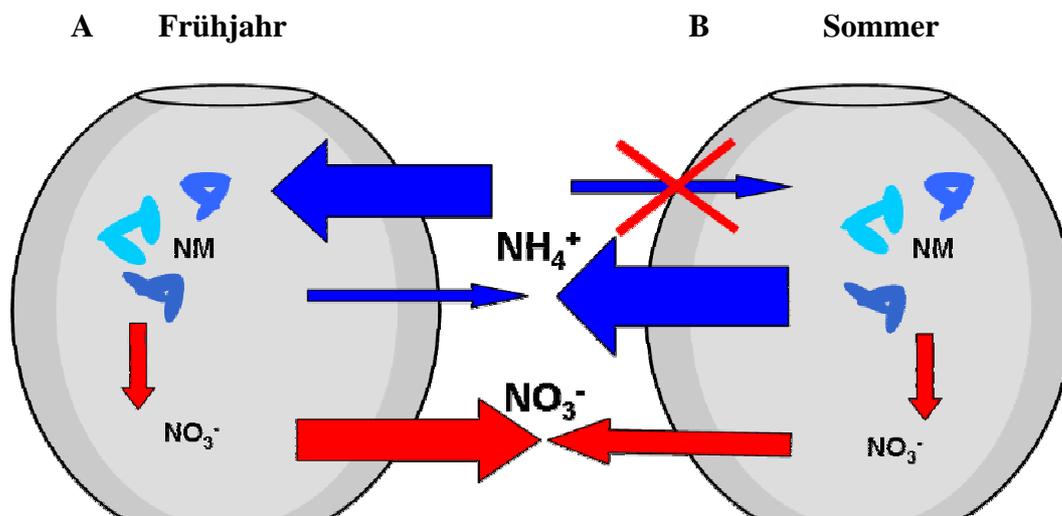


Abbildung 5-4: Schematische Zusammenfassung der Ammonium- (blau) und Nitrat- (rot) Stoffflüsse in *A. aerophoba* im Frühjahr (A) und im Sommer (B); dicke blaue Pfeile symbolisieren hohe Aufnahme bzw. Exkretion von Ammonium, dünne Pfeile geringe Aufnahme bzw. Exkretion. Rote Pfeile symbolisieren die Nitratproduktion im Schwamm. NM: Nitrifizierende Mikroorganismen.

5.2 Die Phylogenie bakterieller und archaealer Nitrifizierer in marinen Schwämmen

Nitrosospira

Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB) sind in terrestrischen und marinen Habitaten weit verbreitet (Kowalchuk und Stephen 2001, Koops *et al.* 2006). In dieser Arbeit konnten AOB in Schwammarten von sechs unterschiedlichen Schwammordnungen nachgewiesen werden. Es konnten erstmals Bakterien des *Nitrosospira* Clusters 1 nachgewiesen werden, von denen es bis heute keinen kultivierten Vertreter gibt (Koops *et al.* 2006). Die Tatsache, dass die 16S rDNA-Phylogenie mit der auf *amoA*-Genen basierenden für marine *Nitrosospira* übereinstimmt, sprechen dafür, dass diese marinen *Nitrosospira* zur Ammoniak-Oxidation befähigt sind (Molina *et al.* 2007). Interessanterweise konnten Bakterien des *Nitrosospira* Clusters 1 in allen untersuchten bakterienhaltigen (HMA) und bakterienfreien (LMA) Schwämmen

nachgewiesen werden. Da aber die bakterienfreien Schwämme in physiologischen Untersuchungen keinerlei Nitrat- oder Nitritexkretion zeigten, scheinen *Nitrosospira* zwar im Mesohyl von LMA-Schwämmen vorhanden, metabolisch aber inaktiv zu sein. Auch in Mittelmeerwasser und Sediment konnten 16S rRNA-Gene von *Nitrosospira* Cluster 1 Bakterien nachgewiesen werden, was die vielfältig untersuchte, weitverbreitete Präsenz dieser β -proteobakteriellen Ammoniakoxidierer widerspiegelt (Phillips *et al.* 1999, Hollibaugh *et al.* 2002, Freitag und Prosser 2003, 2004, O'Mullan und Ward 2005, Molina *et al.* 2007). Die hier nachgewiesenen 16S rRNA-Gene zeigten Sequenzhomologien von über 95% zueinander, sodass eine vollständige Auflösung der Sequenzen innerhalb des *Nitrosospira* Clusters 1 nicht möglich war. Schwamm-spezifische Cluster nach Definition von Hentschel *et al.* (2002) konnten somit nicht klar definiert werden. Sequenzen aus HMA-Schwämmen konnten nicht von Nicht-Schwammsequenzen oder Sequenzen aus LMA-Schwämmen getrennt werden. Es scheint, dass es sich bei den *Nitrosospira*-Bakterien nicht um Symbionten sondern eher um eingestrudelte Bakterien handelt, die über einen gewissen Zeitraum im Mesohyl verbleiben können. Eine Gruppe von Sequenzen ausschließlich aus HMA-Schwämmen stach aus der Analyse aufgrund der hohen ‚Bootstrap‘-Werte hervor. Diese Sequenzen repräsentieren möglicherweise einen Phylotypen, der tatsächlich nur in HMA-Schwämmen vorkommt (Abb. 4-14). Es bleibt abzuwarten, inwieweit dieses Cluster Bestand hat (Bayer *et al.* 2008), wenn in Zukunft mehr Sequenzen in den Datenbanken zur Verfügung stehen.

Obwohl die verwendeten PCR-Primer auch Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* erkennen können, wurden keine zu *Nitrosomonas* verwandten Sequenzen in Schwämmen, Meerwasser oder Sediment identifiziert. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen einer Studie von Diaz *et al.* (2004), in der *Nitrosomonas*-Sequenzen mittels denaturierender Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) in karibischen Mangroven-Schwämmen nachgewiesen wurden. Interessanterweise wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass *Nitrosomonas* und *Nitrosospira* im Mittelmeer unterschiedliche Nischen besetzen. *Nitrosomonas*-Bakterien sind typischerweise Partikel-assoziiert, während *Nitrosospira* die dominante Gruppe im Meerwasser darstellt (Phillips *et al.* 1999). Es scheint daher wahrscheinlich, dass karibische Schwämme eher *Nitrosomonas* aus dem trüben, Partikel-reichen Mangroven-Wasser herausfiltern, während Mittelmeer-Schwämme dagegen in einer Riff-ähnlichen Umgebung mit klarem Wasser verstärkt *Nitrosospira* ausgesetzt sind. Zusätzlich können methodische Parameter zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen. Die Spezifität der verwendeten Primer kann zu einer bevorzugten Amplifikation von Genen zu Gunsten einer bestimmten

Organismengruppe und zum Nachteil einer anderen führen. Auch eine sehr geringe Konzentration von Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze in einer Probe könnte zu negativen Ergebnissen führen.

Die Verwendung der Aminosäure-Sequenz von *amoA*-Genen Ammoniak-oxidierender Bakterien erwies sich in der Vergangenheit als nützlicher Ansatz zur Untersuchung der Diversität und Populationsstruktur von AOB in komplexen Umweltproben (Purkhold *et al.* 2000, Bernhard *et al.* 2007, Molina *et al.* 2007). Von allen drei hier untersuchten HMA-Schwämmen und Mittelmeerwasser als Kontrolle konnten *amoA*-Gensequenzen amplifiziert werden. Die Diversität der erhaltenen *amoA*-Gene war jedoch sehr gering und ließ keine Differenzierung zwischen Schwamm- und Meerwasser-assoziierten Genen zu. Obwohl *amoA*-Gene variabler als 16S rRNA Gene sind (Purkhold *et al.* 2000), konnte hier keine bessere Auflösung erzielt werden. Dies unterstützt die Hypothese dass *Nitrosospira* Bakterien keine echten Schwammsymbionten darstellen, sondern eher ins Mesohyl der Schwämme eingestrudelt werden. Die *amoA*-Phylogenie zeigte, dass alle hier nachgewiesenen Schwamm- und Meerwassersequenzen in die Gruppe der *Nitrosospira* fielen (Bayer *et al.* 2008). Die nächsten verwandten Sequenzen stammten aus marinen Habitaten, wie der Ostsee (Kim *et al.* 2007) oder dem Pazifik (O'Mullan und Ward 2005, Molina *et al.* 2007). Die *amoA*-Gensequenzen der hier vorliegenden Arbeit unterstützen somit die Ergebnisse der 16S rRNA-Genphylogenie dahingehend, dass ein einzelner *amoA*-Phylotyp mit einem 16S rRNA-Gen-Phylotypen korrespondiert und beide dem marinen *Nitrosospira* Cluster 1 angehören. In einer ähnlichen Arbeit wurden 16S rRNA- und *amoA*-Gene aus dem südöstlichen Pazifik amplifiziert (Molina *et al.* 2007). Interessanterweise schienen einige der *amoA*-Sequenzen mit einem 16S rRNA-Phylotypen des *Nitrosospira* Clusters 1 zu korrespondieren. Die Ergebnisse aus Molina *et al.* (2007) stehen somit in Einklang mit den von mir gewonnenen Daten.

Crenarchaea

Die Mehrzahl aller Schwamm-assoziierten Archaeen gehören zu der Gruppe I.1A *Crenarchaeota* und bilden zwei Schwamm-spezifische Cluster (Lee *et al.* 2003, Holmes und Blanch 2006, Taylor *et al.* 2007, Bayer *et al.* 2008). Die meisten Archaeen wurden in bakterienhaltigen HMA-Schwämmen nachgewiesen. Eine Ausnahme stellen *Axinella*-Schwämme dar, die zu den LMA-Schwämmen gehören (Preston *et al.* 1996, Wehrl 2006). Eine Gruppe von Crenarchaeen, die zu *C. symbiosum* nahe verwandt sind, zeigt eine Gattung-spezifische

Assoziation mit *Axinella*-Schwämmen (Holmes und Blanch 2006). In nachfolgenden Studien konnten im Genom von *C. symbiosum* viele Gene des Stickstoffkreislaufs, u. a. auch die Ammoniak-Monooxygenase nachgewiesen werden (Hallam *et al.* 2006a, 2006b). Die Autoren postulierten darauf hin, dass *C. symbiosum* der Ammoniak-Oxidation befähigt ist (Hallam *et al.* 2006a, 2006b). Diese Erkenntnisse liefern auch eine mögliche Erklärung für die hohen in Tabelle 5-1 angegebenen Nitratexkretionsraten für *Axinella*-Schwämme.

In dieser Arbeit konnte ich crenarchaeale 16S rRNA-Gensequenzen erstmals auch aus *A. aerophoba* von zwei unterschiedlichen geografischen Regionen des Mittelmeeres (Frankreich und Kroatien) amplifizieren. Alle fünf Sequenzen zeigten sehr hohe Homologien zu Sequenzen der erst kürzlich beschriebenen Gruppe C1a- α -D (Holmes und Blanch 2006) und waren zu 95 % und 96 % identisch zu *Candidatus* N. maritimus und *Candidatus* C. symbiosum. Die Sequenzen bildet zusammen mit anderen Sequenzen aus HMA-Schwämmen ein Schwamm-spezifisches Cluster, dass durch gute ‚Bootstrap‘-Werte unterstützt wurde. Innerhalb dieses Schwamm-Clusters bildeten die Sequenzen aus *A. aerophoba* ein eigenständiges Cluster mit sehr guten ‚Bootstrap‘-Werten (Bayer *et al.* 2008). Diese Tatsache weist auf eine konsistente Assoziation dieses Phylotypen mit *A. aerophoba* hin und beschreibt möglicherweise ein ausschließlich mit *A. aerophoba* assoziiertes Crenarchaeum. Interessant ist auch hier inwieweit sowohl das Schwammcluster und auch das *A. aerophoba*-Cluster bestehen bleibt, wenn in Zukunft mehr Sequenzen verfügbar sind. Im Gegensatz zu den aus Schwämmen stammenden Sequenzen fielen die beiden aus Meerwasser amplifizierten 16S rRNA-Gene mit marinen, crenarchaealen Nicht-Schwammsequenzen bzw. euryarchaealen Sequenzen zusammen und konnten ganz klar von Schwammsequenzen getrennt aufgelöst werden (Bayer *et al.* 2008).

Erst kürzlich wurde bei der Analyse einer aus einer Bodenprobe konstruierten Metagenombank ein zu bakteriellem *amoA* homologer ORF in unmittelbarer Nähe eines crenarchaealen 16S rRNA-Gens entdeckt (Treusch *et al.* 2005). Daraufhin wurden Archaeen erstmals die Möglichkeit zugesprochen, Ammoniak oxidieren zu können. Denn endgültigen Beweis lieferten Könneke *et al.* (2005) mit der Kultivierung von *Candidatus* Nitrosopumilus maritimus aus Aquariumssubstrat. In dieser Studie konnte die Oxidation von Ammoniak zu Nitrit durch ein Archaeen-Isolat gezeigt werden (Könneke *et al.* 2005). Nachfolgende Studien zeigten dass archaeale Nitrifizierer sehr viel abundanter in terrestrischen wie auch in marinen

Habitaten vorkommen und somit auch eine größere Rollen spielen könnten als ihre bakteriellen Gegenspieler (Francis *et al.* 2005, Leininger *et al.* 2006, Wuchter *et al.* 2006).

Die aus *A. aerophoba* Frankreich (F) und Kroatien (K) amplifizierte *amoA*-Sequenzen zeigten hohe Homologien zueinander und zu vielen Sequenzen aus anderen marinen Habitaten. Eine weitergehende Auflösung zwischen Nicht-Schwammsequenzen und denen aus *A. aerophoba* war nicht möglich (Bayer *et al.* 2008). Aufgrund der nahen Verwandtschaft der Archaeen aus *A. aerophoba* zu *Candidatus* N. maritimus und *Candidatus* C. symbiosum von 96 % und 93 % auf *amoA*-Ebene und sogar 96 % und 95 % auf der Ebene des 16S rRNA-Gens möchte ich die Hypothese aufstellen, dass die spezifisch mit Schwämmen assoziierten Archaeen erheblich zur Ammoniak-Oxidation in marinen Schwämmen beitragen können und neben den *Nitrosospira* wichtig zur Aufrechterhaltung des Stickstoffkreislaufs sind.

5.3 *In-situ* Nachweis Ammoniak-oxidierender Mikroorganismen und die Berechnung Zell-spezifischer Ammoniak-Oxidationsraten

Zum visuellen Nachweis von Nitrifizierern in Bakterienpräparationen von *A. aerophoba* wurden FISH-Sonden verwendet, die spezifisch Ammoniak-oxidierende Bakterien des Subclusters *Nitrosospira* Cluster 1 und Ammoniak-oxidierende Archaeen der Gruppe 1 *Crenarchaeota* nachweisen (Bayer *et al.* 2008). Die Hybridisierungen resultierten in wenigen, aber hellen Signalen, was auf eine hohe Stoffwechselaktivität dieser Mikroorganismen schließen lässt. Schätzungsweise waren ca. 0,125% der angenommenen 10^8 Bakterienzellen g^{-1} (Frischgewicht) Schwamm (Hentschel *et al.* 2001, Webster und Hill 2001) den *Nitrosospira* Cluster 1 zuzuordnen. Dies würde etwa $12,5 \times 10^6$ Zellen g^{-1} (Frischgewicht) entsprechen (Bayer *et al.* 2008). Marine Gruppe 1 *Crenarchaeota* waren ca. 0.25 % der 10^8 Mikroorganismen oder etwa 25×10^6 Zellen g^{-1} (Frischgewicht) nachweisbar (Bayer *et al.* 2008). Unter Verwendung der höchsten in *A. aerophoba* gemessenen Nitratexkretionsrate von $1850 \text{ nmol } g^{-1} \text{ Schwammfrischgewicht Tag}^{-1}$ (entspricht $344 \text{ nmol } g^{-1} \text{ Trockengewicht h}^{-1}$) und einer Schätzung von $37,5 \times 10^6$ Ammoniak-oxidierenden Mikroorganismen (Bakterien und Archaeen zusammen), kann eine Zell-spezifische Oxidationsrate von $1,6 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für Schwamm-assoziierte Nitrifizierer kalkuliert werden. Diese Rate ist höher als die kalkulierten Zell-spezifischen Ammoniak-Oxidationsraten in Sedimenten von salzigen

Flussmündungen ($0,16 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Bernhard *et al.* 2007) und salzigen Sümpfen ($0,004\text{-}0,018 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Dollhopf *et al.* 2005). Für Boden wurden in der Vergangenheit Raten von $0,5\text{-}25,0 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ kalkuliert (Okano *et al.* 2004). Die hier für Schwamm-Nitrifizierer postulierten Zell-spezifischen Raten ($1,6 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ist um eine Log-Stufe höher als die kalkulierte Rate von $0,16 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für den einzig kultivierten Vertreter der marinen *Crenarchaeota*, *Candidatus N. maritimus* (Könneke *et al.* 2005) oder in Experimenten mit Anreicherungskulturen (Wuchter *et al.* 2006). Wenn Schwamm-assoziierten Archaeen Ammoniak in ähnlichen Raten wie der kultivierte *Candidatus N. maritimus* oxidieren, kann der archaeale Beitrag zur Nitrifikation allein nicht die hohen Nitratexkretionsraten in ganzen Schwämmen erklären. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass entweder die Schwamm-assoziierten Archaeen aktiver sind als *Candidatus N. maritimus* oder dass die bakteriellen Ammoniak-Oxidierer metabolisch aktiver sind als die Archaeen. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass bisher nicht identifizierte nitrifizierende Mikroorganismen beteiligt sind.

5.4 Funktionsanalyse nitrifizierender Mikroorganismen mittels Metagenomik

Bei der funktionellen Charakterisierung eines komplexen mikrobiellen Konsortiums wie das von Schwämmen stellt die moderne Methode der Metagenomik einen sehr nützlichen Ansatzpunkt dar (Kimura 2006, Grozdanov und Hentschel 2007). Das Ablegen mikrobieller DNA in geeignete Vektoren und Wirtsbakterien sowie das anschließende Screening nach Markergenen kann erste Einblicke in mögliche Funktionen oder Stoffwechselwege der entsprechenden Mikroorganismen geben, ohne von der Kultivierbarkeit der Mikroorganismen abhängig zu sein. In dieser Promotionsarbeit sollte die bestehende Metagenombank APAE02 mit der genomischen DNA des mit *A. aerophoba* assoziierten mikrobiellen Konsortiums genutzt werden (Fieseler L. 2004), um Informationen über die Gene des Stickstoff-Stoffwechsels von nitrifizierenden Mikroorganismen zu gewinnen.

Die Metagenomklone 4L5 und 8N3 wurden in PCR-basierten Screenings mehrfach positiv auf die Anwesenheit des *Nitrosospira-amoA*-Gens getestet, jedoch verlief deren Sequenzierung

negativ. Die Southern-Blot-Analyse des Klons 8N3 zeigte klar, dass das *amoA*-Gen nicht auf dem Fosmid, dafür aber im Genom des *E. coli*-Wirts zu finden war. Es ist anzunehmen, dass in beiden Fällen genomische Umstrukturierungen stattfanden, die zu einer Deletion des *amoA*-Gens und zur Integration in das Wirtsgenom führte. Die *amoA*, *amoB* und *amoC* Gene kommen bei bekannten Ammoniak-oxidierenden Bakterien normalerweise in einem Operon vor und es muss davon ausgegangen werden, dass das gesamte Operon herausgeschnitten wurde. Man hätte erwartet, dass zumindest einige Proteine auf den Klonen *Nitrosospira* zugeordnet werden können, zumal *Nitrosospira multiformis* ATCC 25196 als nächster kultivierter Verwandter zumindest teilweise sequenziert ist (NCBI-Datenbank). Von nichtkultivierten marinen *Nitrosospira* gibt es außer einer Fülle an 16S rRNA- und *amoA*-Genen keinerlei Sequenzinformationen. Da aber keiner der annotierten ORFs auf den Fosmidklonen Homologien zu *Nitrosospira* Proteinen aufwies, kann die phylogenetische Herkunft der DNA nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Der hier identifizierte und sequenzierte Metagenomklon 58F6 enthielt das vollständige, crenarchaeale AMO-Operon (*amoB*, *amoC*, *amoA*) mit Homologien über 93% zu *Candidatus* N. maritimus und *Candidatus* C. symbiosum (Abb. 5-5). Es konnte somit eindeutig den *Crenarchaeota* zugeordnet werden. Bei der Annotation des Klons war von Vorteil, dass sowohl *Nitrosopumilus maritimus* als auch der Schwamm-assoziierte *Cenarchaeum symbiosum* als nächste Verwandte vollständig sequenziert sind und die genomischen Informationen zum Abgleich in den Datenbanken vorhanden sind. So konnten 28 der insgesamt 54 ORFs Proteinen aus Crenarchaeoten zugeordnet werden. Dass aber nicht allen potentiellen Proteine Homologien von Crenarchaeoten-Proteinen aufweisen, könnte darauf schließen lassen, dass es sich um einen Phylotypen handelt, der aufgrund seiner spezifischen Assoziation mit Schwämmen Proteine kodiert, die dem aus Sediment stammendem *Candidatus* N. maritimus fehlen.

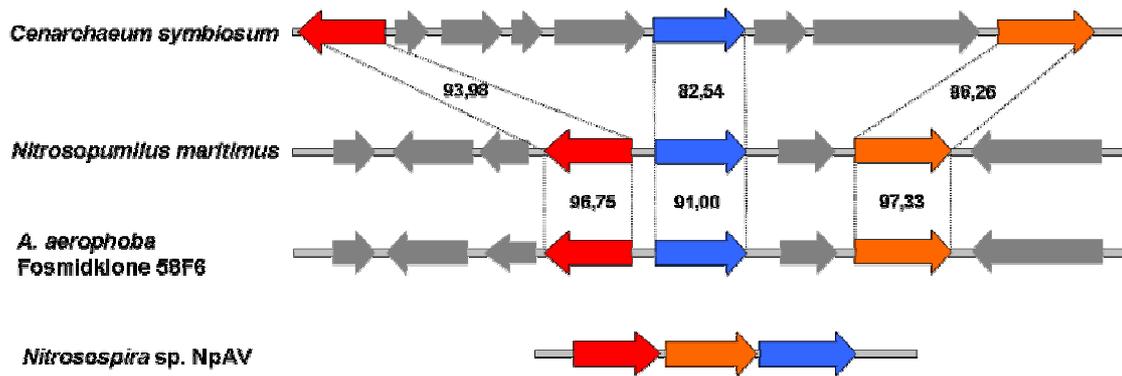


Abbildung 5-5: Vergleich des auf dem Metagenomklon 58F6 kodierten AMO-Operons [*amoB* (rot), *amoC* (blau) und *amoA* (orange)] mit denen von *N. maritimus*, *C. symbiosum* und *Nitrosospira* sp. NpAV. Die Zahlen geben die Homologien auf Aminosäureebene in Prozent an.

Hallam *et al.* (2006a, 2006b) konnten durch die Sequenzierung von Fosmidklonen erste Einblicke in das genomische Potential des nichtkultivierten *Axinella*-Symbionten *C. symbiosum* erlangen. So konnten viele verschiedene Gene des Stickstoffkreislaufs wie beispielsweise die Ammoniak-Monooxygenase, eine Ammoniak-Permease, eine Urease sowie ein Harnstoff-Transport-System identifiziert werden. Diese genomischen Analysen zusammen mit der erstmaligen Kultivierung des nahe Verwandten *N. maritimus* legen nahe, dass sowohl *C. symbiosum* als auch die in *A. aerophoba* nachgewiesenen Crenarchaeen die benötigte Energie direkt aus der Oxidation von Ammonium beziehen. Potentiell zur Ammoniak-Oxidation befähigte Crenarchaeen konnten mittlerweile in sehr vielen Schwämmen nachgewiesen werden (Lee *et al.* 2003, Holmes und Blanch 2006, Taylor *et al.* 2007, Steger *et al.* 2008, Bayer *et al.* 2008), was für eine strikte Assoziation von Crenarchaeen mit Schwämmen spricht.

5.5 Modell der Stoffflüsse und des Stickstoffkreislaufs in *Aplysina aerophoba*

Abschließend möchte ich darstellen, wie sich die Ergebnisse meiner Dissertationsarbeit in das Symbiosekonzept einpassen lassen. Symbiosen beschreiben das Zusammenleben ungleichnamiger Organismen (de Bary 1879), sie sind weit verbreitete und ökologisch bedeutende Interaktionsformen (Douglas 1994). In der Regel bestehen die meisten marinen Symbioseformen lediglich zwischen zwei bzw. wenigen Arten (zusammengefasst in Schmitt *et al.* 2007b). Schwämme stellen aufgrund der äußerst komplexen und phylogenetisch diversen

Zusammensetzung der mit ihnen assoziierten Mikroorganismen sicherlich Ausnahmen dar. Bisher bekannte Symbiosen zeichneten sich häufig durch die Verknüpfung wechselseitiger Stoffflüsse aus. Für *A. aerophoba* ist es mir nun erstmalig gelungen, im Schwamm *A. aerophoba* derartige wechselseitige Stoffflüsse aufzuzeigen und die beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren (Abb. 5-6).

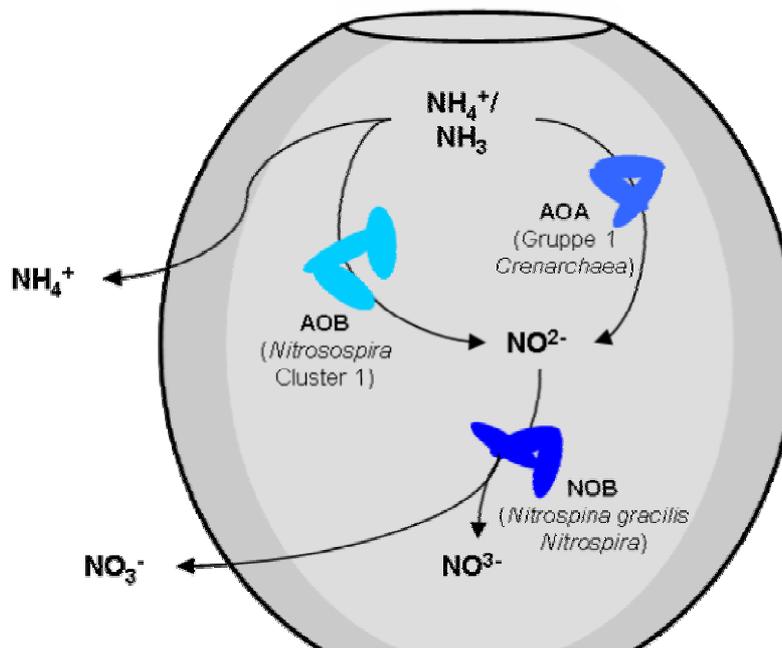


Abbildung 5-6: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit nachgewiesenen Ammoniak-oxidierenden Bakterien und Archaeen in *Aplysina aerophoba* sowie der in Hentschel *et al.* (2002) nachgewiesenen Nitrit-oxidierenden Bakterien.

A. aerophoba bietet assoziierten Mikroorganismen ein geschütztes Habitat und eine reichhaltige Stickstoffquelle in einer sonst nährstoffarmen Umgebung. Das von *A. aerophoba* natürlicherweise ausgeschiedene Ammonium kann von assoziierten Mikroorganismen direkt zur Energiegewinnung genutzt werden. Bakterien des Clusters 1 der *Nitrosospira* (Bayer *et al.* 2007, 2008) und Vertreter der marinen Gruppe 1 *Crenarchaeota* (Bayer *et al.* 2008) wurden identifiziert, die durch die Oxidation des vom Schwamm produzierten Ammoniums profitieren (Abb. 5-6). Beide Gruppen Ammoniak-oxidierender Mikroorganismen konnten erstmals in *A. aerophoba* mittels PCR und FISH nachgewiesen werden (Bayer *et al.* 2008). Basierend auf früheren phylogenetischen Studien ist bekannt, dass auch Nitrit-oxidierende Bakterien zum Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortium von *A. aerophoba* gehören (Hentschel *et al.* 2002, Abb. 5-6). Als direktes Endprodukt der mikrobiellen Nitrifikation

wurde Nitrat von *A. aerophoba* ausgeschieden (Abb. 5-6). Es konnten jedoch keine Bakterien des anaeroben N-Stoffwechsels nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen unserer Studie übereinstimmt, dass das Mesohyl von pumpenden Schwämmen mit Sauerstoff gesättigt ist (Hoffmann *et al.* 2008). Dieses sich auf die aerobe Nitrifikation beschränkende Szenario (Abb. 5-6) deckt sich auch mit den Untersuchungen von M. Pfannkuchen, mir und weiteren Kollegen (in Vorbereitung), dass *A. aerophoba*-Schwämme unter natürlichen Bedingungen nahezu konstant pumpen und somit aerob sind (Pfannkuchen *et al.* in Vorbereitung). Die in dieser Arbeit durchgeführten physiologischen Untersuchungen von Stoffflüssen zwischen *A. aerophoba* und nitrifizierenden Mikroorganismen und der molekulare Nachweis Ammoniak-oxidierender Bakterien und Archaeen (Abb. 5-6) sprechen für eine symbiotische Assoziation zumindest der Crenarchaeen mit Schwämmen. Die vertikale Weitergabe Ammoniak-oxidierender Archaeen von einem Schwamm über die Embryonalstadien in die nächste Schwammgeneration (Steger *et al.* 2008) wird als weiteres Indiz für eine symbiotische Beziehung dieser Organismen mit Schwämmen angesehen und unterstützt die hier aufgestellte Hypothese einer echten Symbiose.

6 Ausblick

In dieser Arbeit gelang es, erste Einblicke in die N-Stoffwechselwege und möglichen Interaktionen zwischen *A. aerophoba* und den assoziierten Mikroorganismen zu gewinnen. Um die Funktionen von Mikroorganismen in marinen Schwämmen zukünftig weitergehend zu untersuchen, bieten sich vielseitige physiologische und molekulare Ansatzpunkte an:

- Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *A. aerophoba* im Frühjahr N-limitiert ist, könnten zukünftig Tracerstudien durch die Zugabe $^{15}\text{NH}_4^+$ (und $^{15}\text{NO}_3^-$) durchgeführt werden. In Zeitserien könnten Gewebeproben der getesteten Schwämme entnommen und die Schwammzellen von den Mikroorganismen durch differenzielle Zentrifugation voneinander getrennt werden. Eine anschließende Analyse der $\delta^{15}\text{N}$ -Werte beider Fraktionen kann Aufschluss über mikrobielle Assimilationsprozesse innerhalb des Schwammes geben und das Modell des Stickstoffkreislaufs in *A. aerophoba* vervollständigen. Durch die Verwendung von radioaktiv markierten C-Quellen in Lebendschwamm-Inkubationen könnten die Untersuchungen zu wechselseitigen Stoffflüssen innerhalb der Schwamm-Mikroben-Assoziation auch auf den Kohlenstoffkreislauf ausgeweitet werden. Durch eine Dokumentation mittels Mikroautoradiomikrographie, kombiniert mit FISH, könnten Stoffwechselprozesse einzelnen innerhalb des mikrobiellen Konsortiums zugeordnet werden.
- Eine zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführte *in-situ* und ggf. auch *in-vivo* Beprobung des Wassers, welches von Schwämmen direkt an den Ostien eingestrudelt wird, („inhaled“), sowie die Analyse der in dieser Wasserprobe vorhandenen Nahrungsquellen könnte zukünftig Aufschluss über die Zusammensetzung der *A. aerophoba* zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen in einem saisonalen Zyklus geben. Eine gleichzeitige Probennahme des den Schwamm verlassenden Oskulumwassers („exhaled“) ließe Rückschlüsse auf die tatsächlich verstoffwechselten Nahrungsbestandteile und Kohlenstoffmengen zu.

- Um in Zukunft bestimmte Funktionen oder Stoffwechselwege gezielt einem einzelnen mikrobiellen Phylotypen in *A. aerophoba* zuordnen zu können, ist die Methodik der ‚single cell genomics‘ als Weiterführung des metagenomischen Ansatzes ein sehr nützliches Werkzeug. Nach Vereinzeln des mikrobiellen Konsortiums mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) kann anschließend unter Verwendung der phi29-Polymerase und Hexanukleotid-Primern das Genom einer einzelnen Zelle amplifiziert werden (WGA-whole genome amplification). Mit diagnostischen PCRs könnten somit funktionelle Gene und damit Stoffwechselwege einem Mikroorganismus aus dem komplexen Konsortium aus *A. aerophoba* zugeordnet werden.
- In dieser Arbeit gelang der Nachweis von zwei verschiedenen Gruppen Ammoniak-oxidierender Mikroorganismen im Schwamm *A. aerophoba*. Zukünftig bieten sich RNA-basierte Aktivitätsstudien an, um quantitativ aufzuklären, wie groß der Beitrag von *Nitrosospira* und *Crenarchaeota* zur hier beschriebenen Ammoniak-Oxidation ist. Nach der Isolation von RNA und anschließenden quantitativen PCRs (RT-qPCR) könnten für beide Nitrifizierer-Gruppen sowohl die relativen Abundanzen als auch die jeweiligen relativen oder absoluten Aktivitäten über die Anzahl der mRNA-Kopien eines bestimmten funktionellen Gens bestimmt werden. Auf diese Weise können sowohl die beiden Organismengruppen untereinander verglichen werden, als auch mögliche saisonal bedingte Unterschiede in der Zusammensetzung oder Aktivität der Nitrifizierer bestimmt werden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius, Temperatur
Abb.	Abbildung
AIX	Ampicillin-, IPTG- und X-Gal enthaltendes Nährmedium
AOA	Ammonium-oxidierende Archaeen
AOB	Ammonium-oxidierende Bakterien
ASW	synthetisches Seewasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cm	Chloramphenicol
CMFASW	Calcium-/Magnesiumfreies, synthetisches Seewasser
cy3	Indocarbocyanin
DAPI	Diamino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ECM	extracelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
<i>et al.</i>	‚ <i>et altera</i> ‘: und weitere
EtOH	Ethanol
6-FAM	6-Carboxylflourescein-Succinimidyl-Ester
g	Gramm, Masse
h	Stunde, Zeit
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
‚insert‘	eingefügter DNA-Abschnitt
<i>in vivo</i>	im lebenden Zustand
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin

kb	Kilobasen
μ	Mikro, 10 ⁻⁶ x
m	Milli, 10 ⁻³ x
m	Meter, Länge
M	molar, 1 mol l ⁻¹
min	Minute/n, Zeit
Mio.	Million, 10 ⁶
MO	Mikroorganismen, Bakterien
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
NOB	Nitrit-oxidierende Bakterien
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
OD ₍₆₀₀₎	optische Dichte bei λ=600
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	„Polymerase-Chain-Reaction“, Polymerasekettenreaktion
Pellet	Niederschlag, Sediment nach Zentrifugation
PFA	Paraformaldehyd
r ²	Bestimmtheitsmaß
Ref.	Referenz
RFLP	Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n, Zeit
S	Svetberg, Sedimentationskoeffizient
sp.	„species“: Biologie: Art
„template“	Matrizen-DNA
T _m	Schmelztemperatur
U	„units“: funktionelle Mengeneinheit bei Enzymen
ÜN	über Nacht
unkult.	unkultiviert
UV	ultraviolettes Licht

V	Volt, elektrische Spannung
Vol.	Volumenteil
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7.2 Geräte, Materialien, Chemikalien, Kits, Programme

Tabelle 7-1: Geräte und Materialien

Geräte	Firma	Artikelbezeichnung
Aquariumspumpen	VitaKraft	3000
Autoklaven	Fedegari	Tec 120, 9191E, FV 3.3
	H+P Labortechnik	Varioklav 500, 135S
Brutschrank	Heraeus	Kelvitron®t
	Memmert	TV 40b
CLSM-Scanmodul	Zeiss	LSM510
Mikroskop		Axiovert 100M
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-Laser2	Lasos	633 nm, 15 mW
Argon-Laser	Lasos	458, 488, 514 nm, 25 mW
Destillieranlage für H ₂ O _{dd}	GFL	Bi-Dest 2304
Einmalküvetten	Plastibrand	halbmikro 1,5 ml
Eismaschine	Scotsman	AF-20
Elektrophoresekammern	BioRad	-
Elektroporationsgerät	EquiBio	Easyject PRIMA
Elektroporationsküvetten	EquiBio	EPC 102
Filterapparaturen	Nalgene	300-4050
	Sartorius	516-7015
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss	Axiolab
Quecksilberdampfampe		HBO 50
Objektive		Plan-Apochromat 10x/ 0,30
Objektive		Plan-Apochromat 20x/ 0,50
		Plan-Apochromat 40x/ 0,75
		Plan-Apochromat, Öl 40x/ 1,30
		Plan-Apochromat, Öl 100x/ 1,30
Fluoreszenz-Filterset		10, 15
Kamera-System	Intas	MP Focus 5000

Geräte	Firma	Artikelbezeichnung
Gefrierschränke	Liebherr	Superöko
-20°C	Privileg	
	Nunc	QBF 2185V36
-80°C	Kendro	Queue Basic QBF 2585V36
Geldokumentation	BioRad	Gel Doc 2000
Handvakuumpumpe	Nalgene	6133-0010
Heizblock	Laboratory Devices	Digi-Block Jr.
Heizspirale	Julabo	U3/8
Hybridisierungsöfen	Memmert	BE 200
Imager	Intas	ChemiLux
Kühlschrank	Privileg	Superöko
Mikropipetten	Microlab	MicroOne 0,5-10 µl
	Microlab	MicroOne 2-20µl
	Microlab	MicroOne 20-200µl
	Microlab	MicroOne 100-1000µl
Mikrowelle	AEG	Micromat
	Privileg	8020
Mörser	Hartenstein	MÖ10
Netzgeräte	Consort	E455
Nitex-Gewebe	Hartenstein	Polyester, 100µm
Nylonmembran	Whatman	Nytran SPC
Objektträger	Superior Marienfeld	Microslides mit 8-Feldern
	Knittel Gläser	OTMM
PCR-Cycler	Biometra	T3-Thermocycler
Pistill	Hartenstein	PIS3
pH-Meter Elektrode	WTW	MultiLine P4
		SenTix 41
Photometer	Pharmacia Biotech	Ultraspec 3000
Reaktionsgefäße	Sarstedt	1,5 ml; 2,0 ml
	Abgene	0,5 ml Thermo tubes
	Abgene	0,2 ml Thermo Stripes
	Greiner	15 ml, 50 ml Bio-one CELLSTAR®
Replikastempel	Nalgen Nunc International	384 pin replicator
Schüttler	Braun	Certomat U
	Edmund Bühler	SM-30
	Eppendorf	Rotationsmischer 3300
	Infors	HT

Fortsetzung Tabelle7-1: Geräte und Materialien

Geräte	Firma	Artikelbezeichnung
Schüttler	New Brunswick	Innova 4230, 4300
	Renner	Celloshaker Variospeed Variotime
Sequencer	Applied Biosystems	ABI Prism 310 Genetic Analyser
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech	Ultraspec 3000
Sterilbänke Klasse 2	Nunc	M50726/ 1
	Heraeus	HERA safe HS 12
Transilluminationstisch UV	Brunschwig Chemie	N-90M, 6x 15 W
UV-Crosslinker	BioRad	GS GeneLinker
Versuchaquarien, 5l	Buchsteiner	Eimer, M.MB, #3102
Vortexer	Scientific industries	Vortex-Genie 2
Whatmanpapier	Whatman	
Waagen	Chyo	JL-180
	Kern	470-36
	Ohaus	Navigator

Fortsetzung Tabelle 7-1: Geräte und Materialien.

Tabelle 7-2: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agar, granuliert	Difco
Agarose, ultrapur	Gibco
N-Allylthioharnstoff (C ₄ H ₈ N ₂ S)	Fluka
Ammoniumacetat (CH ₃ COONH ₄)	Roth
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat (H ₂₄ Mo ₇ N ₆ O ₂₄ x 4 H ₂ O)	Fluka
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	AppliChem
Ampicillin (Amp)	AppliChem
Borsäure (H ₃ BO ₃)	AppliChem
5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem
Chloramphenicol	Sigma
Citifluor	Citifluor Ltd.
Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma
Dichlorisocyanursäure (C ₃ Cl ₂ N ₃ O ₃ Na)	Sigma
Eisensulfat-Heptahydrat (FeSO ₄ x 7 H ₂ O)	Fluka
Essigsäure	AppliChem
Ethanol absolut (EtOH)	Merck

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol vergällt (EtOH)	Roth
1 % Ethidiumbromid-Lösung	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Serva
para-Formaldehyd (PFA)	Serva
Formamid (HCONH_2)	Roth
Formamid, HiDi	AppliedBiosystems
Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
86 % Glycerin ($\text{HOCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$)	Roth
Hefeextrakt	Gibco
Isopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$)	Roth
1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumbromid (KBr)	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
Kanamycin (Kan)	Merck
Kobaldchlorid-Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
Manganchlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin-Dihydrochlorid ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{H}$)	Sigma
Natriumacetat-Trihydrat ($\text{NaAc} \times 3 \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
Natriumazid (NaN_3)	Sigma
Natriumchlorat (NaClO_4)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck
Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	AppliChem
Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Natriumnitrat (NaNO_3)	Merck
Natriumnitrit (NaNO_2)	AppliChem
Natriumsulfat (Na_2SO_4)	Merck
Natriumnitroprussid-Dihydrat ($\text{C}_5\text{FeN}_6\text{Na}_2\text{O} \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Nikotin	Sigma
Phenol (kristallin) ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)	AppliChem

Bezeichnung	Hersteller
Salzsäure (HCl)	AppliChem
Strontiumchlorid-Hexahydrat ($\text{SrCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Sulfanilamid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)	Sigma
Trinatriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	AppliChem
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid (Tris/HCl)	Sigma
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Zinksulfat-Heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma

Fortsetzung Tabelle 7-2: Chemikalien

Tabelle 7-3: Enzyme und Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
EasyPrep® Pro	Biozym
ECL-System (inkl. Detektionslösungen und Hybridisierungspuffer)	Amersham
Fast DNA Spin Kit (for soil)	Q-Biogene
pGEM T easy Vector System	Promega
pGEM T Vector System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma
Restriktionsendonucleasen zzgl. Reaktionspuffer	New England Biolabs (NEB)
RNase A aus Rinderpankreas	Roche
Taq DNA Polymerase zzgl. Reaktionspuffer	Qiagen
Größenstandards DNA	
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas
FastRuler™ DNA Ladder, High Range	Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder, High Range	Fermentas

Tabelle 7-4: Verwendete Software

Programm	Anwendung	Referenz
ABI Prism™ Software	Auswertung und Darstellung von Sequenz-Chromatogrammen	http://www.appliedbiosystems.com/support/software/3100/conversion.cfm
Adobe Photoshop	Bildbearbeitung	http://www.adobe.com/
Align (Version 08/2003)	Sequenzalignments	Hepperle 2002
ARB	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf 16S rRNA Nucleotidsequenzen	http://www.arb-home.de/
Basic Local Alignment Search Tool (Blast)	Nucleotid- und Aminosäure- Sequenz Datenbankvergleiche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Chimera Check	Überprüfung von 16S rDNA Genen auf Chimäre	http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU
ClustalX	Nukleinsäure- und Aminosäurealignments	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html
Microsoft® Excel	Auswertung und Darstellung von Exkretionsraten	http://office.microsoft.com/
LSM Image Browser	Darstellung und Bearbeitung von Fluoreszenzbildern am cLSM	http://www.zeiss.com
Multi Analyst 1.1	Dokumentation von Agarosegelen	BioRad
MrBayes	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf Aminosäuresequenzen	http://mrbayes.csit.fsu.edu/
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Phylip	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf Nuclein- und Aminosäuresequenzen	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html
Pintail	Überprüfung von 16S rDNA Genen auf Chimäre	http://www.bioinformatics-toolkit.org/Pintail/index.html
Primer 3	Generation von Primersequenzen	http://frodo.wi.mit.edu/
SPSS® Version 10	Statistische Auswertungen	www.spss.com/de
Treeview	Visualisierung phylogenetischer Stammbäume nach ARB und Phylip	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Vector NTI Advance™ 10	Sequenzauswertungen	https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=userGroup.downloadCenter

7.3 Lösungen, Medien und Puffer

Die Sterilisation der Lösungen, Medien und Puffer erfolgte durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 121°C. Nicht hitzestabile Zusätze wurden sterilfiltriert und nötigenfalls nach Abkühlung auf handwarme Temperatur zugegeben, Platten wurden mit ebenfalls handwarm abgekühltem Agar gegossen.

• 1M Ampicillin-Stocklösung	Ampicillin (Amp)	3,71 g
	H ₂ O _d	ad 10.0 ml
	sterilfiltrieren	
• Artificial Sea Water (ASW)	NaCl	234.7 g
	Na ₂ SO ₄	39.2 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	106.4 g
	CaCl ₂	11.0 g
	NaHCO ₃	1.92 g
	KCl	6.64 g
	KBr	0.96 g
	H ₃ BO ₃	0.26 g
	SrCl ₂	0.24 g
	NaF	0.03 g
	H ₂ O _d	ad 10 l
• 1M CaCl ₂ -Stocklösung	CaCl ₂	5.5 g
	H ₂ O _d	50 ml
	sterilfiltrieren	
• Chloramphenicol-Stocklösung	Chloramphenicol (Cm)	12,5 mg
	EtOH (99,9%)	10 ml
• Citratpuffer	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ x 2H ₂ O	27 g
	H ₂ O _d	50 ml
	0.5 M NaOH	2 ml
• Denaturierungslösung	NaCl	90 g
	NaOH	20 g
• DTT-Reagenz	C ₃ Cl ₂ N ₃ O ₃ Na	50 mg
	0.5M NaOH	20 ml
	stets frisch ansetzen	
• Ethidiumbromid-Färbebad	1 % EtBr-Lösung	0.2 ml
	H ₂ O _d	ca. 500 ml

• 0.5M EDTA	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	136.1 g
	H ₂ O _{dd}	ad 1000 ml
	pH 8.0 einstellen	
• 2M Glucose-Stocklösung	C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	19.817 g
	H ₂ O _{dd}	50 ml
	sterilfiltrieren	
• Hybridisierungspuffer (FISH)	5 M NaCl	362.0 µl
	1 M Tris/HCl, pH 8.0	40.0 µl
	Formamid	x µl
	H ₂ O _{dd}	ad 2 ml
	10 % SDS	4.0 µl
• 1M IPTG-Lösung	IPTG	2.38 g
	H ₂ O _d	ad 10.0 ml
• 1M KCl	KCl	3.727 g
	H ₂ O _d	50 ml
	sterilfiltrieren	
• Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Hefeextrakt	5.0 g
	Pepton	10.0 g
	NaCl	5.0 g
	H ₂ O _d	ad 1.0 l
	(Agar)	15.0 g
• LB/Cm-Medium	Cm-Stocklösung	1.0 ml
	LB-Medium	1.0 l
• LB/Amp-Medium	1M Amp-Stocklösung	1.0 ml
	LB-Medium	1.0 l
• LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar (LB-AIX)	10% Ampicillin-Lösung	1.0 ml
	1M IPTG-Lösung	1.0 ml
	5% X-Gal-Lösung	1.26 ml
	LB-Agar	1.0 l

• 1M MgSO ₄ -Stocklösung	MgSO ₄ x 7H ₂ O	12.324g
	H ₂ O _d	50 ml
	sterilfiltrieren	
• 1M NaCl	NaCl	2.922 g
	H ₂ O _{dd}	50 ml
	sterilfiltrieren	
• 0.5M NaOH	NaOH	20 g
	H ₂ O _d	1 l
• 5M NaCl	NaCl	292.2 g
	H ₂ O _d	ad 1000 ml
• NED-Lösung	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ ClH	100 mg
	H ₂ O _d	100 ml
• Neutralisationslösung	Tris/HCl	121.0 g
	NaCl	120g
	H ₂ O _d	ad 1 l
• 10 x PBS Puffer	NaCl	40.0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	6.25 g
	KH ₂ PO ₄	1.0 g
	KCl	1.0 g
	H ₂ O _d	ad 500 ml
	mit HCl auf pH 7.2 einstellen	
• 4% PFA-Lösung	PFA	4.0g
	1 x PBS	ad 100 ml
• Phenollösung	C ₆ H ₆ O	8 g
	in 30 ml EtOH und 60 ml H ₂ O _d lösen	
	C ₅ FeN ₆ Na ₂ O x 2 H ₂ O	60 mg
	in 10 ml H ₂ O _d lösen, zur Phenollösung geben	

- Plasmid-Mini-Präparation

Puffer 1	1M Tris-HCl, pH 7.5	5.0 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	2.0 ml
	RNase 10 mg/ml	1.0 ml
	H ₂ O _d	ad 100 ml

Puffer 2	NaOH	0.8 g
	SDS	1.0 g
	H ₂ O _d	ad 100 ml

Puffer 3	NaAc x 3 H ₂ O	40.8 g
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	pH 4.8 einstellen	

- 1% RNase A-Stocklösung

RNase A	10.0 mg
H ₂ O _d	1.0 ml

- 10% SDS-Lösung

SDS	10 g
H ₂ O _d	100 ml

- SOC-Medium

Pepton	2.0 g
Hefeextrakt	0.5 g
1M NaCl	1 ml
1M KCl	1 ml
2M MgCl	1 ml
2M Glucose	1 ml
H ₂ O _{dd}	ad 100 ml

- Stopp-Puffer

Bromphenolblau	25.0 mg
Xylencyanol	25.0 mg
Ficoll Type 400	2.5 g
H ₂ O _d	ad 10 ml

- 20 x SSC

Natriumcitrat	172g
NaCl	350g
H ₂ O _d	ad 2 l

- | | | |
|-------------------------------------|---|--------------|
| • Sulfanilamidlösung | $C_6H_7NO_3S$ | 1.0 g |
| | In 10 ml HCL und 60 ml H_2O_d lösen und auf 100 ml auffüllen. | |
| • 50 x TAE | Tris/HCl | 242.0 g/l |
| | Essigsäure | 57.1 ml |
| | 0.5M EDTA, pH 8.0 | 100.0 ml |
| | H_2O_d | ad 1000 ml |
| • 1M Tris/HCl | Tris/HCl | 121.0 g |
| | H_2O_d | ad 1000 ml |
| | pH 7.5 bzw. pH 8.0 einstellen | |
| • 10 x TPE | EDTA | 20 mM |
| | Tris-Base (pH 8,0) | 890 mM |
| | pH 8,0 mit H_3PO_4 einstellen | |
| • Waschpuffer
(FISH) | 1M Tris/HCl | 1.0 ml |
| | 0.5M EDTA | 0.5 ml |
| | NaCl | x μ l |
| | 10% SDS | 50.0 μ l |
| | H_2O_{dd} | ad 50 ml |
| • Waschpuffer I
(Southern-Blot) | SDS | 0,4% |
| | SSC | 0,4x |
| | H_2O_d | ad 1000 ml |
| • Waschpuffer II
(Southern-Blot) | SSC | 2x |
| • 5% X-Gal-Lösung | X-Gal | 0.5 g |
| | H_2O_{dd} | ad 10 ml |

7.4 Verwendete Mikroorganismen

Der apathogene Stamm *Escherichia coli* XL1 blue wurde zur Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation von DNA-Fragmenten und der Stamm *Escherichia coli*-K12 DH5 α wurde als Negativkontrolle für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen herangezogen. Beide Stämme wurden der Stammsammlung des Instituts entnommen. Der Stamm *E. coli* JBC 606 wurde von Prof. Jeff Cole von der School of Biochemistry (University of Birmingham, England) zur Verfügung gestellt.

7.5 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma SigmaGenosys (Steinheim, Deutschland) synthetisiert (http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Sigma_Genosys.html). Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung verwendete Oligonukleotide, waren entweder mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) oder mit dem roten Carbocyaninfarbstoff (Cy3) markiert. Alle in den Sequenzierungen, PCR-Reaktionen oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 7-5 aufgelistet. Die Primer AA1F und AA1R zur Amplifikation von *amoA*-Genen bakterieller Nitrifizierer wurden mittels des Computerprogramms ‚Primer 3‘ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) generiert.

Tabelle 7-5: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Methode	T _m [°C]	Fragment [bp]	FA [%] FISH	Ziel-Struktur	Spezifität	Referenz
27f 1492r	GAGTTTGATCCTGGCTCA TACGGYTACCTTGTTACGACTT	PCR	53,7 57,5	ca. 1470	--	16S rRNA	bakterielles 16S rRNA Gen (universell)	Lane (1991)
T7 SP6	GAATTGTAATACGACTCACTATAG GATTTAGGTGACACTATAGAATA	PCR	52,0 48,6	--	--	pGEM T easy Vektor	Sequenzierung	Promega
A189 AmoA2-R	GGNGACTGGGACTTCTGG CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	PCR	60,7 62,9	675	--	<i>amoA</i>	β-proteobakterielle Ammonia-Monooxygenase, Untereinheit A	Holmes <i>et al.</i> (1995) Purkhold <i>et al.</i> (2000)
AA1F AA1R	CAGGCGTACCAGTACGAACA ATTGGAAAGACCGTCAGTGG	PCR	63,7 63,8	430	--	<i>amoA</i>	β-proteobakterielle Ammonia-Monooxygenase, Untereinheit A	diese Arbeit
AOB189f AOB1224r	GGAGAAAAGCAGGGGATCG CGCCATTGTATTACGTGTGA	PCR	65,8 62,0	1030	--	16S rRNA	16S rRNA Gen von Ammonium-oxidierenden Betaproteobakterien	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Arch21F Arch958R	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA YCCGGCGTTGAMTCCAATT	PCR	74,0 67,4	930	--	16S rRNA	archaeales 16S RNA Gen (universell)	DeLong (1992)

Name	Sequenz 5' - 3'	Methode	T _m [°C]	Fragment [bp]	FA [%] FISH	Ziel-Struktur	Spezifität	Referenz
<i>amo111F</i> <i>amo643R</i>	TTYTAYACHGAYTGGGCHTGGACATC TCCCACCTTWGACCARGCGGCCATCCA	PCR	66,4 81,7	530	--	<i>amoA</i>	Crenarchaeale Ammonia-Monooxygenase, Untereinheit A	Treusch <i>et al.</i> (2005)
<i>Amx156f</i> <i>Amx223f</i> <i>Amx820f</i> <i>Amx820r</i> <i>Amx1249r</i> <i>pla46f</i>	CGGTAGCCCCAATTGCTT GACATTGACCCCTCTCTG AAAACCCCTCTACTTAGTGCC GGCACTAAGTAGAGGGGTTTT GGTTGGTACAAAGGGATGCTAAA GGATTAGGCATGCAAGTC	PCR	56,0 58,0 60,0 60,0 64,6 58,0	600-1200	--	16S rRNA	„ <i>Ca. Brocardia anammoxidans</i> “ Genera „ <i>Ca. Brocardia</i> “ und „ <i>Ca. Kuenenia</i> “ <i>Ca. Brocardia anammoxidans</i> “ <i>Planctomacetales</i>	Schmid <i>et al.</i> (2000) Neef <i>et al.</i> (1998)
<i>nirK1F</i> <i>nirK5R</i>	GGMATGGTKCCSTGGCA GCCTCGATCAGRCCAGGGTTTC	PCR	59,4 70,0	510	--	<i>nirK</i>	Nitritreduktase-Gen denitrifizierender Bakterien	Braker <i>et al.</i> (1998)
<i>Amx820</i>	TAATTCCTCTACTTAGTGCCC	FISH	46*	--	40	16S rRNA	anaerobe Ammonium-oxidierende Bakterien, „ <i>Ca. Brocardia anammoxidans</i> “ und „ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> “	Schmid <i>et al.</i> (2000)
<i>Cren569</i>	GCTACGGATGCTTTAGG	FISH	46*	--	0-10	16S rRNA	die meisten Umwelt-Crenarchaea	Jurgens <i>et al.</i> (2000)

Fortsetzung Tabelle 7-5: verwendete Oligonukleotide. T_m - Schmelztemperatur, (*) Hybridisierungstemperatur

Name	Sequenz 5' - 3'	Methode	T _m [°C]	Fragment [bp]	FA [%] FISH	Ziel-Struktur	Spezifität	Referenz
EUB338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FISH	46*	--	0-50	16S rRNA	die meisten Bakterien	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	FISH	46*	--	0-50	16S rRNA	Planctomycetales	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	FISH	46*	--	0-50	16S rRNA	Verrucomicrobiales	Daims <i>et al.</i> (1999)
GI-554	TTAGGCCCAATAATCMTCCT	FISH	46*	--	0-15	16S rRNA	marine Gruppe I Crenarchaea	Massana <i>et al.</i> (1997)
NspCL1_249	CTTTTACCTTACCAACAA	FISH	46*	--	0-10	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> Cluster 1	Stephen <i>et al.</i> (1998)

Fortsetzung Tabelle 7-5: verwendete Oligonukleotide. T_m - Schmelztemperatur, (*) Hybridisierungstemperatur

8 REFERENZEN

- AAKRA A., UTAAKER J.B. UND NES I.F.** (2001) Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**: 237-242.
- ALTSCHULT S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W. UND LIPMAN D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**: 3389-3402.
- AMANN R.I., KRUMHOLZ L., UND STAHL D.A.** (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 762-770.
- AMANN R.I.** (1995) Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* **4**: 543-554.
- ASHELFORD K.E., CHUZHANOVA N.A., FRY J.C., JONES A.J. UND WEIGHTMAN A.J.** (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7724-7736.
- BAYER K.** (2004) Untersuchungen zum Stickstoffkreislauf des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* und assoziierten Mikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- BAYER K., SCHMITT S. UND HENTSCHEL U.** (2007) Microbial nitrification in Mediterranean sponges: Possible involvement of ammonium-oxidizing *Betaproteobacteria*. *Proc. 7th Int. Sponge Sym.* Custódio, M.R., Hajdu, E., Lôbo-Hajdu, G. und Muricy, G. (eds). Rio de Janeiro: Museu Nacional. pp. 165-171.
- BAYER K., SCHMITT S. UND HENTSCHEL U.** (2008) Physiology, phylogeny and *in situ* evidence for bacterial and archaeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Environ. Microbiol.* online pub: DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01582.x
- BELSER L.W. UND MAYS E.L.** (1980) Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 505-510.
- BELSER L.M. UND SCHMIDT E.L.** (1981) Inhibitory effect of nitrapyrin on three genera of ammonia-oxidizing nitrifiers. *Environ. Microbiol.* **41**: 819-821.
- BERNHARD A.E., TUCKER J., GIBLIN A.E. UND STAHL D.A.** (2007) Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environ. Microbiol.* **9**: 1439-1447.
- BEROUNSKY V.M. UND NIXON S.W.** (1993) Rates of nitrification along an estuarine gradient in Narragansett Bay. *Estuaries* **16**: 718-730.
- BLUNT J.W., COPP B.R., MUNRO M.H., NORTHCOTE P.T. UND PRINSEP M.R.** (2006) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 26-78.

- BOCK A.K. UND WAGNER M.** (2006) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In: *Prokaryotes* **2**: 457-495. DOI: 10.1007/0-387-30742-7_16.
- BRUSCA R.C. UND BRUSCA G.J.** (1990) Phylum Porifera: The sponges. In *Invertebrates*. Sinauer, A.D. (ed). Sunderland: Sinauer Press, pp. 181-210.
- CAFFREY J.M., HARRINGTON N.E., SOLEM I. UND WARD B.B.** (2003) Biogeochemical Processes in a small California estuary: 2. Nitrification activity, community structure and role in nitrogen budgets. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **248**: 27-40.
- CAMPBELL N.E.R. UND ALEEM M.I.H.** (1965) The effect of 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine on the chemoautotrophic metabolism of nitrifying bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **31**: 124-144.
- CAPONE D.G.** (2000) The marine microbial nitrogen cycle. In *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman, D.L. (ed). New York: Wiley-Liss. pp. 455-494.
- CORREDOR J.E., WILKINSON C.R., VICENTE V.P., MORELL J.M. UND OTERO E.** (1988) Nitrate release by Caribbean reef sponges. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 114-120.
- CORREDOR J.E. UND CAPONE D.G.** (1985) Studies on nitrogen diagenesis in coral reef sands. In *Proc. 5th Int. Coral Reef Cong.* **3** Garies C. (Ed). Moorea: Antenne Museum-EPHE, pp. 395-399.
- DAIMS H, BRÜHL A, AMANN R, SCHLEIFER KH, WAGNER M.** (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-44.
- DAVY, S.K., TRAUTMAN, D.A., BOROWITZKA, M.A. UND HINDE R.** (2002) Ammonium excretion by a symbiotic sponge supplies the nitrogen requirements of the rhodophyte partner. *J. Exp. Biol.* **205**: 3505-3511.
- DAWSON S.C., DELONG E.F. UND PACE N.R.** (2006) Phylogenetic and ecological perspectives on uncultured Crenarchaeota and Korarchaeota. In: *Prokaryotes* **3**: 281-289. DOI: 10.1007/0-387-30743-5_15.
- DE BARY A.** (1879) Die Erscheinung der Symbiose. *Naturforschung Versammlung Cassel, LI, Tagebl.*: p. 121.
- DELONG E.F.** (1992) Archaea in costal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5685-5689.
- DIAZ C.M. UND WARD B.B.** (1997) Sponge-mediated nitrification in tropical benthic communities. *Microb. Ecol. Prog. Ser.* **156**: 97-107.
- DIAZ M.C. UND RÜTZLER K.** (2001) Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs. *Bull. Mar. Sci.* **69**: 535-546.
- DIAZ C.M., AKOB D. UND CARY C.S.** (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis of nitrifying microbes associated with tropical sponges. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova* **68**: 279-289.

- DOLLHOPF S.L., HYUN J.H., SMITH A.C., ADAMS H.A., O'BRIEN S. UND KOSTKA J.E.** (2005) Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 240-246.
- DOUGLAS A.E.** (1994) Symbiotic interactions. Oxford University Press, New York. ISBN 0-19-854294-1
- DUDECK K.L. UND DUSTMAN W.A.** (2001) Amplification of the amoA Gene of *Nitrosococcus oceani* Bacteria Using Eppendorf® MasterTaq® WWW-Dokumen: URL <http://www.biomedicine.org/biology-technology>
- ERESKOVSKY A.V., GONOBLEVA E. UND VISHNYAKOV A.** (2005) Morphological evidence for vertical transmission of symbiotic bacteria in the viviparous sponge *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarca). *Mar. Biol.* **146**: 869-875.
- FIESELER L.** (2005) Entdeckung des neuen Candidatus Phylums *Poribacteria*. Dissertation, Universität Würzburg.
- FIESELER L., HORN M., WAGNER M. UND HENTSCHEL U.** (2004) Discovery of a novel candidate phylum '*Poribacteria*' in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3724-3732.
- FIESELER L., QUAISER A, SCHLEPER C UND HENTSCHEL U.** (2006) Analysis of the first genome fragment from the marine sponge-associated, novel candidate phylum *Poribacteria* by environmental genomics. *Environ. Microbiol.* **8**: 612-24.
- FRANCIS C.A., ROBERTS K.J., BEMAN J.M., SANTORO A.E. UND OAKLEY B.B.** (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**: 14683-14688.
- FRIEDRICH A.B., MERKERT H. FENDERT T., HACKER J., PROKSCH P. UND 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., HACKER J., FISCHER I., PROKSCH P. UND HENTSCHEL U.** (2001) Temporal variations of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 105-113.
- FREITAG T.E. UND PROSSER J.I.** (2003) Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl. Environl. Microb.* **69**: 1359-1371.
- FREITAG T.E. UND PROSSER J.I.** (2004) Differences between betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3789-3793.
- FROST T.M.** (1987) Porifera. In: Pandian TJ, Vernberg FJ (eds) Animal energetics, Vol. 1 Academic Press, London. pp. 27-53.
- GORING C.A.I.** (1962) Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine. *Soil Sci.* **93**: 211-218.

- GRAY J.S., WU R.S. UND OR Y.Y.** (2002) Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **238**: 249-279.
- GROZDANOV L. UND HENTSCHEL U.** (2007) An environmental genomics perspective on the diversity and function of marine sponge-associated microbiota. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 215-220.
- GARSON M.J., ZIMMERMANN M.P., BATTERSHILL C.N., HOLDEN J.L. UND MURPHY P.T.** (1994) The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids.* **29**: 509-16.
- HALLAM S.J., MINCER T.J., SCHLEPER C., PRESTON C.M., ROBERTS K., RICHARDSON P.M. UND DELONG E.F.** (2006a) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *Crenarchaeota*. *PLoS Biol.* **4**: e95.
- HALLAM S.J., KONSTANTINIDIS K.T., PUTNAM N., SCHLEPER C., WATANABE Y., SUGAHARA J., PRESTON C., DE LA TORRE J., RICHARDSON P.M. UND DELONG E.F.** (2006b) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 18296-18301.
- HATZENPICHLER R., LEBEDEVA E.V., SPIECK E., STOECKER K., RICHTER A., DAIMS H. UND WAGNER M.** (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 2134-2139.
- HENTSCHEL U., SCHMID M., WAGNER M., FIESELER L., GERNERT C. UND HACKER J.** (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *A. cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 305-312.
- HENTSCHEL U., HOPKE J., HORN M., FRIEDRICH A.B., WAGNER M., HACKER J. UND MOORE B.S.** (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microb.* **68**: 4431-4440.
- HENTSCHEL U., USHER K.M. UND TAYLOR M.W.** (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 167-177.
- HEPPERLE D.** (2002) Align: a multicolor sequence alignment editor. WWW-Dokument: <http://science.do-mix.de/software.phd>.
- HILL R.T.** (2004) Microbes from marine sponges: A Treasure Trove of Biodiversity for Natural Products Discovery. In: Microbial diversity and bioprospecting. Bull, A.T. (ed) Washington DC:ASM Press, pp. 177-190.
- HOFFMANN F., LARSEN O., THIEL V., RAPP H.-T., RAPE T., MICHAELIS W. UND REITNER J.** (2005) An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiol. J.* **22**: 1-10.
- HOFFMANN F., RØY H., BAYER K., HENTSCHEL U., PFANNKUCHEN M., BRÜMMER F. UND DE BEER D.** (2008) Oxygen and pumping dynamics in the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar. Biol.* **153**: 1257-1264.

- HOLLIBAUGH J.T., BANO N. UND DUCKLOW H.W.** (2002). Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1478-1484.
- HOLMES A., COSTELLO A., LIDSTROM M. UND MURRELL J.** (1995) Evidence that particulate monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.
- HOLMES B.M. UND BLANCH H.W.** (2006) Genus-specific associations of marine sponges with group I crenarchaeotes. *Mar. Biol.* **150**: 759-772.
- HOOPER J.N.A. UND VAN SOEST R.W.M.** (2002) *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges, volume 1.* Plenum Publishers, New York: Pergamon Press.
- HYNES R.K. UND KNOWLES R.** (1983) Inhibition of chemoautotrophic nitrification by sodium chlorate and sodium chlorite: a reexamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1178-1182.
- INGALLS A.E., SHAH S.R., HANSMAN R.L., ALUWIHARE L.I., SANTOS G.M., DRUFFEL E.R.M. UND PEARSON A.** (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 6442-6447.
- JIMÉNEZ E. UND RIBES M.** (2007) Sponges as a source of dissolved inorganic nitrogen: nitrification mediated by temperate sponges. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 948-958.
- JONES R.D. UND HOOD M.A.** (1980) Effects of temperature, pH, salinity, and inorganic nitrogen on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from wetland environments. *Microb. Ecol.* **6**: 339-347.
- JURGENS G., GLÖCKNER F., AMANN R., SAANO A., MONTONEN L., LIKOLAMMI M. UND MUNSTER U.** (2000). Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 45-56.
- KIM O.S., JUNIER P., IMHOFF J.F. UND WITZEL K.P.** (2007) Diversity of ammonia-oxidizing bacteria in the water column and sediment of two lakes and the Baltic Sea. (NCBI-Datenbank)
- KIMURA N.** (2006) Metagenomics: Access to unculturable microbes in the environment. *Microbes Environ.* **21**: 201-215.
- KLOTZ M.G., ALZERRECA J. UND NORTON J.M.** (1997) A gene encoding a membrane protein exists upstream of the amoA/amoB genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon? *FEMS Microbiol. Lett.* **150**: 65-73.
- KÖNNEKE M., BERNHARD A.E., DE LA TORRE J.R., WALKER C.B., WATERBURY J.B. UND STAHL D.A.** (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- KOOPS H.-P., PURKHOLD U., POMMERENING-RÖSER A., TIMMERMANN G. UND WAGNER M.** (2006). The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: *Prokaryotes* **5**: 778-811. DOI: 10.1007/0-387-30745-1_36.

- KOWALCHUK G.A. UND STEPHEN J.R.** (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 485-529.
- LAM P., JENSEN M.M., LAVIK G., MCGINNIS D.R., MUELLER B., SCHUBERT C.J., AMANN R., THAMDRUP B. UND KUYPERS M.M.M.** (2007) From the cover: Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 7104-7109.
- LANE D.J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt und M. Goodfellow (ed.) *Nucleic techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom. pp. 115-175.
- LEE Y.K., LEE J.H. UND LEE H.K.** (2001) Microbial symbiosis in marine sponges. *J. Microbio* **39**: 254-264.
- LEE E.Y., LEE H.K., LEE Y.K., SIM C.J. UND LEE J.H.** (2003) Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea. *Biomol. Eng.* **20**: 299-304.
- LEININGER S., URICH T., SCHLOTTER M., SCHWARK L., QI J., NICOL G.W., PROSSER J.I., SCHUSTER S.C. UND SCHLEPER C.** (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806-809.
- LI C.W., CHEN J.Y. UND HUA T.E.** (1998) Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**: 879-82.
- LUDWIG W., STRUNK O., WESTRAM R., RICHTER L., MEIER H., YADHUKUMAR, BUCHNER A, LAI T, STEPPI S, JOBB G, FORSTER W, BRETTSCHE I, GERBER S, GINHART AW, GROSS O, GRUMANN S, HERMANN S, JOST R, KONIG A, LISS T, LUSSMANN R, MAY M, NONHOFF B, REICHEL B, STREHLOW R, STAMATAKIS A, STUCKMANN N, VILBIG A, LENKE M, LUDWIG T, BODE A UND SCHLEIFER K.H.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic. Acids. Res.* **32**: 1363-71.
- MAGALHÃES C.M., JOYE S.B., MOREIRA R.M., WIEBE W.J. UND BORDALO A.A.** (2005) Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Wat. Research* **39**: 1783-1794.
- MANZ W., ARP G., SCHUMANN-KINDEL G., SZEZYK U. UND REITNER J.** (2000) Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescent *in situ* hybridization to show the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Meth.* **40**: 125-134.
- MASSANA R., MURRAY A., PRESTON C. UND DELONG E.F.** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 50-56.
- McClintock J.B. UND BAKER B.J.** (2001) *Marine chemical ecology*. CRC Press, Boca Rotan, Florida, p. 610
- MINCER T.J., CHURCH M.J., TAYLOR L.T., PRESTON C., KARL D.M. UND DELONG E.F.** (2007) Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the north pacific subtropical gyre. *Environ. Microbiol.* **9**: 1162-1175.

- MOBARRY B.K., WAGNER M., URBAIN V., RITTMANN B.E. UND STAHL D.A.** (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2156-2162.
- MOLINA V., ULLOA O., FARIAS L., URRUTIA H., RAMÍREZ S., JUNIER P. UND WITZEL K.P.** (2007) Ammonia-oxidizing β -proteobacteria from the oxygen minimum zone off northern Chile. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3547-3555.
- MÜLLER W.E.G. UND MÜLLER I.M.** (2003) Analysis of the sponge (*Porifera*) gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. In: Müller W.E.G. (Ed.) Sponges (*Porifera*). *Prog. Mol. Subcell. Biol.* Springer, Heidelberg. pp. 1-33.
- MÜLLER W.E., BATEL R., MÜLLER I.M. UND SCHRÖDER H.C.** (2004) Cultural heritage: porifera (sponges), a taxon successfully progressing paleontology, biology, biochemistry, biotechnology and biomedicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* **546**: 325-58.
- NICOL G.W. UND SCHLEPER C.** (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends. Microbiol.* **14**: 207-212.
- NORTON J.M., ALZERRECA J.J., SUWA Y. UND KLOTZ M.G.** (2002). Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **77**: 139-149.
- OLSON J.B. UND MCCARTHY P.J.** (2005). Associated bacterial communities of two deepwater sponges. *Aquat. Microb. Ecol.* **39**: 47-55.
- O'MULLAN G.D. UND WARD B.B.** (2005) Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 697-705.
- OKANO Y., HRISTOVA K.R., LEUTENEGGER C.M., JACKSON L.E., DENISON R.F., GEBREYESUS B., LEBAUER D. UND SCOW K.M.** (2004) Application of real-time pcr to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1008-1016.
- OSINGA R., ARMSTRONG E., BURGESS J.G., HOFFMANN F., REITNER J. UND SCHUMANN-KINDEL G.** (2001) Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* **461**: 55-62.
- OSINGA R., BELARBI E.H., GRIMA E.M., TRAMPER J. UND WIJFFELS R.H.** (2003) Progress towards a controlled culture of the marine sponge *Pseudosuberites andrewsi* in a bioreactor. *J. Biotech.* **100**: 141-146.
- PARSONS T.R., MAITA Y. UND LALLI C.M.** (1984) Manual of chemical and biological methods for seawater analysis. New York: Pergamon Press.
- PAUL V.J., PUGLISI M.P. UND RITSON-WILLIAMS R.** (2006) Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 153-80.

- PFANNKUCHEN M., FRITZ G.B., SCHLESINGER S., BAYER K. UND BRÜMMER F.** (in Vorbereitung) In situ pumping activity of the sponge *Aplysina aerophoba*, Nardo 1886.
- PHILLIPS C., SMITH Z., EMBLEY T.M. UND PROSSER J.I.** (1999) Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class *Proteobacteria* in the northwestern Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 779-786.
- PILE A.J.** (1997) Finding Reiswig's missing carbon: Quantification of sponge feeding using dual-beam flow cytometry. *Proc. 8th Int. Coral Reef Sym.* **2**: 1403-1410.
- POSPESEL M., HENTSCHEL U. UND FELBECK H.** (1998) Determination of nitrate in the blood of the hydrothermal vent tubeworm *Riftaria pachyptila* using nitrate reduction assay. Pergamon *Deep Sea Res. I* **45**: 2189-2200.
- PRESTON C.M., WU K.Y., MOLINSKI T.F. UND DELONG E.F.** (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6241-6246.
- PROKSCH P., EBEL R., EDRADA R.A., SCHUPP P., LIN W.H., SUDARSONO, WRAY V. UND STEUBE K.** (2003): Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure Appl. Chem.* **75**: 343-352.
- PURKHOLD U., POMMERENING-RÖSER A., JURETSCHKO S., SCHMID M., KOOPS H.P. UND WAGNER M.** (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5368-5382.
- PURKHOLD U., WAGNER M., TIMMERMANN G., POMMERENING-RÖSER A. UND KOOPS H.P.** (2003) 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1485-1494.
- RAPPÉ M.S. UND GIOVANNONI S.J.** (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 369-394.
- REISWIG H.M.** (1971) In situ pumping activities of tropical Demospongiae. *Mar. Biol.* **9**: 38-50.
- RIBES M., COMA R. UND 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.
- SAND-JENSEN K. UND PETERSEN M.F.** (1994) Photosynthesis by symbiotic algae in the freshwater sponge, *Spongilla lacustris*. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 551-561.
- SCHEUERMAYER M.** (2006) Phylogenie, Sekundärmetabolismus und biotechnologisches Potential mariner, Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen. Dissertation. Universität Würzburg.

- SCHILLER R.** (2006) Untersuchungen zur Bakterienhaltigkeit in karibischen Schwämmen und ausgewählten Reproduktionsstadien. Diplomarbeit Universität Würzburg.
- SCHLEPER C., JURGENS G. UND JONUSCHEIT M.** (2005) Genomic studies of uncultured Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 479- 488.
- SCHMID M.C., MAAS B., DAPENA A., VAN DE PAS-SCHOONEN K., VAN DE VOSSENBERG J., KARTAL B., VAN NIFTRIK L., SCHMIDT I., CIRPUS I., KUENEN J.G., WAGNER M., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., KUYPERS M., REVSBECH N.P., MENDEZ R., JETTEN M.S.M. UND STROUS M.** (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1677-1684.
- SCHMITT S., WEHRL M., LINDQUIST N., WEISZ J.B. UND HENTSCHEL U.** (2007a) Morphological and molecular analyses of microorganisms in Caribbean reef adult sponges and in corresponding reproductive material. In *Proc. 7th Int. Sponge Sym.* Custódio, M.R., Hajdu, E., Lôbo-Hajdu, G., und Muricy, G. (Ed). Rio de Janeiro: Museu Nacional. pp. 561-568.
- SCHMITT S., WEHRL M., BAYER K., SIEGL A. UND HENTSCHEL U.** (2007b) Marine Sponges as models for commensal microbe-host interactions. *Symbiosis* **44**: 43-50.
- SCHMITT S. UND HENTSCHEL U.** (2008) Schwämme und Mikroorganismen - eine uralte Assoziation. *BioSpektrum* **2**: 140-143.
- SCHUMANN-KINDEL G., BERGBAUER M., MANZ W., SZEWZYK U. UND REITNER J.** (1996) Aerobic and anaerobic microorganisms in modern sponges: a possible relationship to fossilisation processes. *Facies* **36**: 268-272.
- SIMPSON T.L.** (1984) The cell biology of sponges. Springer Verlag
- SIPKEMA D.** (2004) Cultivation of Marine Sponges: From Sea to Cell. Dissertation, Wageningen University.
- SOUTHWELL M.W., POPP B.N. UND MARTENS C.S.** (2008) Nitrification controls on fluxes and isotopic composition of nitrate from Florida Keys sponges. *Mar. Chem.* **108**: 96-108.
- STEGER D, ETTINGER-EPSTEIN P., WHALAN S., HENTSCHEL U., DE NYS R., WAGNER M. UND TAYLOR M.W.** (2008) Diversity and mode of transmission of ammonia-oxidizing archaea in marine sponges. *Environ. Microbiol.* **10**: 1087-1094.
- STEPHEN J. R., KOWALCHUK G.A., BRUNS M.A.V., MCCAIG A. E., PHILLIPS C. J., EMBLEY T.M. UND PROSSER J.I.** (1998) Analysis of beta-subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2958-2965.
- TAYLOR M.W., RADAX R., STEGER D. UND WAGNER M.** (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 295-347.

- TESKE A., ALM E., REGAN J.M., TOZE S., RITTMANN B.E. UND STAHL D.A.** (1994) evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacterio.* **176**: 6623-6630.
- THOMPSON S.P., PAERL H.W. UND GO M.C.** (1995) Seasonal patterns of nitrification and denitrification in a natural and a restored salt marsh. *Estuaries* **18**: 399-408.
- THOMS C., EBEL R. UND PROKSCH P.** (2006) Activated chemical defense in sponges of the genus *Aplysina* revisited. *J. Chem. Ecol.* **32**: 97-123.
- TREUSCH A.H., LEININGER S., KLETZIN A., SCHUSTER S.C., KLENK H.P. UND 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**: 1985-1995.
- URIZ M.J., TURON X., GALERA J. UND TUR J.M.** (1996) New light on the cell location of avarol within the sponge *Dysidea avara* (Dendroceratida). *Cell Tissue Res.* **285**: 519-527.
- USUI T., KOIKE I. UND OGURA N.** (2001) N₂O production, nitrification and denitrification in an estuarine sediment. *Estuarine* **52**: 769-781.
- VACELET J.** (1970) Description de cellules a bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. *J. Microscopie* **9**: 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. Microsc. Biol. Cell.* **23**: 271-288.
- VACELET J., BOURY-ESNAULT N., FIALA-MEDIONI A. UND FISHER C. R.** (1995) A methanotrophic carnivorous sponge. *Nature* **377**: 296.
- VACELET J. UND BOURY-ESNAULT N.** (1995) Carnivorous sponges. *Nature* **373**: 333-335.
- VACELET J., FIALA-MEDIONI A., FISHER C.R. UND BOURY-ESNAULT N.** (1996) Symbiosis between methane-oxidizing bacteria and a deep-sea carnivorous cladorhizid sponge. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **145**: 77-85.
- VENTER J.G., 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., PFANNKUCH C., ROGERS H. UND SMITH H.O.** (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- WAFAR M., WAFAR S. UND DAVID J.J.** (1990) Nitrification in reef corals. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 725-730.
- WEHRL M.** (2001) Untersuchungen zur Interaktion des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* mit assoziierten Mikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

- WEHRL M.** (2006) Bakterielle Aufnahme, Selektivität und interne Prozessierung bei marinen Schwämmen (Porifera). Dissertation, Universität Würzburg.
- WEHRL M., STEINERT M. UND HENTSCHEL U.** (2007) Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb. Ecol.* **53**: 355-65.
- WEBSTER N.S. UND HILL R.T.** (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**: 843-851.
- WELSH D.T. UND CASTADELLI G.** (2004) Bacterial nitrification activity directly associated with isolated benthic marine animals. *Mar. Biol.* **144**: 1029-1037.
- WIENS M., KORZHEV M., KRASKO A., THAKUR N.L., PEROVIĆ-OTTSTADT S., BRETER H.J., USHIJIMA H., DIEHL-SEIFERT B., MÜLLER I.M. UND 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**: 27949 - 27959.
- WILLIAMS R E .** (1980) The fresh-water sponges (Porifera: Spongillidae) of Colorado. *Nat. Hist. Inventory of Colorado*. **4**: 1-12.
- WILKINSON C.R.** (1978a) Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**: 161 - 167.
- WILKINSON C.R.** (1978b) Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar. Biol.* **49**: 169 - 176.
- WILKINSON C.R.** (1978c) 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. In: Schwemmler W., Schenk H.E.A. (Eds.): *Endocytobiology, endosymbiosis, and cell biology*. Walter de Gruyter, Berlin. pp. 553 - 563.
- WILKINSON C.R.** (1983) Net primary productivity in coral reef sponges. *Science* **219**: 410-412.
- WILKINSON C.R.** (1987) Significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology. *Symbiosis* **4**: 135 - 146.
- WILKINSON C.R. UND GARRONE R.** (1980) Nutrition of marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. In: Smith D.C., Tiffon Y. (Ed.): *Nutrition in the lower Metazoa*. Pergamon Press, Oxford. pp. 157 - 161.
- WUCHTER C., ABBAS B., COOLEN M.J.L., HERFORT L., VAN BLEIJSWIJK J., TIMMERS P., STROUS M., TEIRA E., HERNDL G.J., MIDDELBURG J.J., SCHOUTEN S. UND SINNINGHE DAMSTÉ J.S.** (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 12317-12322.

YAHIEL G., SHARP J.H., MARIE D., HÄSE C. UND GENIN A. (2003) *In situ* feeding and element removal in the coral-reef sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC is the major source for carbon. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 141-149.

YAHIEL G., WHITNEY F., REISWIG H.M., EERKES-MEDRANO D.I. UND LEYS S.P. (2007) *In situ* feeding and metabolism of glass sponges (Hexactinellida, Porifera) studied in a deep temperate fjord with a remotely operated submersible. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 428-440.

9 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

BAYER K, SCHMITT S. UND HENTSCHEL U. (2007) Microbial nitrification in Mediterranean sponges: Possible involvement of ammonia-oxidizing *Betaproteobacteria*. Porifera research: biodiversity, innovation, sustainability. Série Livros. Museu Nacional, Rio de Janeiro, Proceedings of the 7th International Sponge Symposium: pp. 165-171.

SCHMITT S., WEHRL M., **BAYER K.**, SIEGL A. UND HENTSCHEL U. (2007) Marine Sponges as models for commensal microbe-host interactions. *Symbiosis* **44**: 43-50.

HOFFMANN F., RØY H., **BAYER K.**, HENTSCHEL U., PFANNKUCHEN M., BRÜMMER F., DE BEER D. (2008) Oxygen dynamics and transport in the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biology* **153**: 1257-1264

BAYER K, SCHMITT S. UND HENTSCHEL U. (2008) Physiology, phylogeny and *in situ* evidence for bacterial and archaeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Environmental Microbiology* online pub: DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01582.x

BAYER K., SIEGL A., SCHMITT S., HOFFMANN F. UND HENTSCHEL U. (im Druck) Unravelling microbial diversity and metabolism in marine sponges. *Acta Leopoldina – Life Strategies of Microorganisms in the Environment and in Host Organisms*.

SIEGL A., **BAYER K.**, KOZITSKAYA S., HENTSCHEL U. UND SCHMITT S. (eingereicht) New Frontiers in Sponge Microbiology. *Vie et Millieu - Life and Environment*

Tagungsbeiträge

BAYER K, SCHMITT S. UND HENTSCHEL U. (2006) Microbial Nitrification in *Aplysina aerophoba* Posterbeitrag 7th International Sponge Symposium, Buzios, Brasilien

BAYER K, SCHMITT S. UND HENTSCHEL U. (2007) From Diversity to function: Microbial Nitrification in the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* Posterbeitrag Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie Osnabrück, Deutschland

HOFFMANN F., RØY H., **BAYER K.**, HENTSCHEL U., PFANNKUCHEN M., BRÜMMER F., DE BEER D. BOETIUS A. (2006) Microbial Life in a fluctuating chemical Environment - Oxygen dynamics in the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* Posterbeitrag 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), Wien, Österreich

10 Forschungsaufenthalte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 14-tägige Expeditionen zur Durchführung praktischer Feldarbeiten:

nach Banyuls sur Mer/ Frankreich an das Laboratoire d Arago im April 2003,

nach Rovinj/ Kroatien an das Institut Ruđer Bošković im April und August 2003, Juni 2004, August/September 2004, Mai 2005 und April 2006.

11 Lebenslauf

Kristina Bayer

geboren am 06.11.1977 in Naumburg /Saale

Schulbildung

1992-1996 Städtisches Gymnasium Mittweida

1984-1992 Goethe-Oberschule Kriebethal

Studium

2004-2008 Anfertigung der Doktorarbeit „Physiologie, Phylogenie und metagenomische Analyse Ammoniak-oxidierender Bakterien und Archaeen im Mittelmeerschwamm *Aplysina aerophoba*“ am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg
Betreuerin: PD Dr. Ute Hentschel

2005-2007 Mitglied der Graduiertenschule "Infektionsforschung" der Universität Würzburg

2003-2004 Anfertigung der Diplomarbeit „Untersuchungen zum Stickstoffkreislauf des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* und assoziierten Mikroorganismen“ am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg
Betreuerin: PD Dr. Ute Hentschel

1996-2004 Biologiestudium an der Universität Würzburg
Schwerpunkt: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik
Pflanzenphysiologie