

Untersuchungen zur Diversität, Abundanz und vertikalen Weitergabe von Bakterien in marinen Schwämmen



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

vorgelegt von
Volker Glöckner
aus
Lichtenfels

Würzburg, Juni 2013

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

1. Gutachter: Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida

2. Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchungen zur Diversität, Abundanz und vertikalen Weitergabe von Bakterien in marinen Schwämmen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 05. Juni 2013

(Volker Glöckner)

Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an folgende Personen:

Prof. Ute Hentschel Humeida für die herzliche Betreuung während dieser Doktorarbeit, den Mut einen Tierphysiologen in ihr Team aufzunehmen, sowie für den steten Glauben, dass ich meinen Weg Richtung „Verteidigung“ finden werde.

Prof. Roy Gross für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Markus Riederer als Institutsleiter des Lehrstuhls für Botanik II - Ökophysiologie und Vegetationsökologie an der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dr. Kristina Bayer für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Betreuung im Labor.

Hilde (meiner Lieblings-Expeditions-Tauchpartnerin), Janine, Lucas, Usama, Sheila, Paula, Eva, Tine, allen Studenten die ich während meiner Zeit in der Arbeitsgruppe betreuen und kennenlernen durfte, sowie allen anderen jetzigen und ehemaligen Kollegen und Freunden des Schwammlabors, sowie des gesamten Lehrstuhls für Botanik II - Ökophysiologie und Vegetationsökologie an der Universität Würzburg. Es war wunderbar, ein Teil dieses Teams sein zu dürfen.

Dr. Susanne Schmitt (LMU München) für die interessanten Diskussionen über Bakterienphylogenie, das Berechnen der in dieser Arbeit gezeigten phylogenetischen Bäume, sowie für die gute Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Projekte.

Dr. Alexander Ereskovsky (Universität Marseille, Frankreich) für die Bereitstellung der *Oscarella* Proben, die gute Zusammenarbeit während unseres gemeinsamen Projektes, sowie für die Hilfestellung beim Interpretieren der hier gezeigten mikroskopischen Aufnahmen von *Ectyoplasia ferox* Embryonen.

Prof. Christopher Martens (University of North Carolina at Chapel Hill, USA) für die Gastfreundschaft während der Feldarbeit in Key Largo.

Prof. Niels Lindquist (University of North Carolina at Chapel Hill, USA) für die Gastfreundschaft und Betreuung während der Feldarbeit in Key Largo. Ich hätte das Arbeiten unter Wasser von keinem anderen besser lernen können. Mein spezieller Dank geht auch an das gesamte Team des „NOAA’s Undersea Research Centers“, die stets dafür gesorgt haben, dass wir sicher vom Meeresgrund wieder zurück ans Land kamen.

Prof. Joseph Pawlik (University of North Carolina Wilmington, USA) für die Gastfreundschaft und Betreuung während der Bahamas Expedition, sowie dem gesamten Team der RV Walton Smith und RV Cape Hatteras für ihre Unterstützung.

Prof. Georg Krohne (Universität Würzburg), sowie dessen Mitarbeiterinnen Daniela Bunsen und Claudia Gehrig für ihre Unterstützung bei der Erstellung der TEM und REM Aufnahmen.

Meinen Eltern dafür, dass sie mich immer haben machen lassen, mich stets unterstützt haben und mich zu dem Menschen formten der ich heute bin. Familie und Freunden für die jahrelange Unterstützung und vor allem für die Ablenkungen, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich ein klein bisschen schneller geschrieben gewesen wäre.

Gewidmet:

Der NEUGIERDE,
denn sie ist es, die die Forschung
von der Wissenschaft unterscheidet!
(Volker Glöckner)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Abstract	1
2	Einleitung	6
2.1	Phylum Porifera	6
2.1.1	Taxonomie.....	6
2.1.2	Morphologie und Lebensweise	7
2.2	Schwämme und ihre assoziierten mikrobiellen Konsortien	11
2.2.1	Das Konzept der HMA- und LMA-Schwämme.....	11
2.2.2	Mikrobielle Diversität	12
2.2.3	Mögliche Interaktionen zwischen Schwämmen und ihren Symbionten	14
2.2.4	Vertikale Weitergabe vs. horizontale Aufnahme von Schwamm-Symbionten.....	16
2.3	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Materialsammlung	21
3.1.1	Adultes Schwammmaterial.....	21
3.1.2	Reproduktives Schwammmaterial.....	22
3.1.3	Probenverarbeitung	22
3.1.4	Antibiotika.....	22
3.2	Molekulare Methoden	25
3.2.1	Lichtmikroskopie.....	25
3.2.2	Transmissions-Elektronen Mikroskopie.....	25
3.2.3	Raster-Elektronen Mikroskopie	25
3.2.4	Quantifizierung von Bakterien in adultem Schwammgewebe	26
3.2.5	Extraktion genomischer DNA.....	27
3.2.6	DNA- und RNA-Extraktion	27
3.2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	28
3.2.8	Herstellung hitzekompetenter Zellen	29
3.2.9	Klonierung von PCR-Produkten	29
3.2.10	Plasmid-Mini-Präparation	30
3.2.11	Sequenzierung	31
3.2.12	Sequenzierauswertung.....	31
3.2.13	Phylogenetische Sequenzanalyse	32
3.2.14	Elektrophoretische Methoden.....	32
3.2.15	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese.....	33

Inhaltsverzeichnis

4	Ergebnisse	35
4.1	<i>Ectyoplasia ferox</i> als Modellschwamm zur Untersuchung der vertikalen Weitergabe von Schwammsymbionten	35
4.1.1	Reproduktion in <i>Ectyoplasia ferox</i>	35
4.1.2	Mikroskopische Untersuchungen von Adult-, Embryonal- und Larval-Material	37
4.1.3	Untersuchungen zur mikrobiellen Abundanz in reproduktiven Stadien	39
4.1.4	Beschreibung der mikrobiellen Diversität und Analysen zur phylogenetischen Gemeinschaft	40
4.1.5	Erstellung eines Aktivitätsprofils von Adult-, Embryonal- und Larval-Stadien	47
4.1.6	Antibiotika-Behandlung von Schwammlarven zur Erzeugung symbiontenfreier Juvenil-Schwämme	48
4.2	Untersuchung zur mikrobiellen Diversität von Schwämmen der Gattung <i>Oscarella</i>	50
4.2.1	Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität verschiedener Schwammarten mittels DGGE	50
4.2.2	Erstellung einer 16S rRNA-Genbank für <i>Oscarella lobularis</i>	51
4.2.3	Beschreibung bakterieller Morphotypen in verschiedenen <i>O. lobularis</i> Farbvariationen	54
4.2.4	Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität in verschiedenen <i>O. lobularis</i> Farbvariationen mittels DGGE	56
4.2.5	Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften von <i>O. lobularis</i> aus unterschiedlichen Standorten und Meerestiefen	57
4.3	Untersuchungen zur Bakterienhaltigkeit verschiedener karibischer Schwämme	59
4.3.1	Einteilung in HMA/LMA mittels DAPI-Zählungen	59
4.3.2	Einteilung in HMA/LMA mittels DGGE	59
4.3.3	Einteilung in HMA/LMA mittels TEM	61
4.3.4	Zusammenfassung der erhobenen Daten zu HMA- und LMA-Schwämmen	62
4.3.5	Zusammenfassung der Daten zu HMA- und LMA-Schwämmen der letzten Jahre	63
5	Diskussion	65
5.1	Vertikale Weitergabe von Schwammsymbionten in dem karibischen Modellschwamm <i>Ectyoplasia ferox</i>	65
5.2	Vergleich der mikrobiellen Diversität verschiedener <i>Oscarella</i> -Arten	72
5.3	Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Bakterienhaltigkeit von Schwämmen	76
6	Ausblick	80
7	Anhang	82
7.1	Abkürzungsverzeichnis	82

Inhaltsverzeichnis

7.2	Geräte, Materialien, Chemikalien.....	85
7.3	Lösungen und Puffer	90
7.4	Enzyme und Reaktionskits.....	94
7.5	Medien	95
7.6	Mikroorganismen und Vektoren.....	96
7.7	Größenstandards	96
7.8	Oligonukleotide	98
7.9	Programme.....	99
7.10	Schwammproben.....	100
8	Referenzen.....	103
9	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	115
9.1	Publikationen	115
9.2	Tagungsbeiträge.....	116
10	Feldarbeit und Forschungsaufenthalte	117
11	Fortbildungen und Workshops	118
11.1	In Zusammenhang mit Lehre	118
11.2	In Zusammenhang mit der Feldarbeit.....	118
12	Lebenslauf.....	119

1 Zusammenfassung

Marine Schwämme (Phylum Porifera) gehören mit ihrem ersten Auftreten im Präkambrium vor ungefähr 580 Millionen Jahren zu den ältesten Vertretern der Metazoen weltweit. Ähnlich lange leben sie wahrscheinlich schon in Symbiose mit Mikroorganismen. In der vorliegenden Doktorarbeit soll der karibische Schwamm *Ectyoplasia ferox* als Modellsystem zur Erforschung der Schwamm-assoziierten mikrobiellen Konsortien, deren Weitergabe und Interaktionen mit dem Schwamm, vorgestellt werden. Mit Hilfe von 16S rRNA-Genbanken sowie der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) konnte gezeigt werden, dass Symbionten aus sechs der in *E. ferox* gefundenen acht Phyla sowie der „sponge-associated unclassified lineage“ SAUL vertikal an die nächste Schwammgeneration weitergegeben werden. Mittels phylogenetischer Analysen wurden insgesamt 21 „vertical transmission“ (VT) Cluster identifiziert, von denen 19 in „sponge specific“ Cluster (SSC) bzw. „sponge coral“ Clustern (SCC) lagen. Daraus kann man schließen, dass ein Großteil des mikrobiellen Konsortiums von *E. ferox* über die reproduktiven Stadien weitergegeben wird. Auch konnten zwei Cyanobakterien identifiziert werden, die nicht in den reproduktiven Stadien vorhanden waren und höchstwahrscheinlich horizontal aus dem umgebenden Meerwasser aufgenommen wurden. Eine Reduzierung von 50% der Symbionten im Mesohyl nach dem „spawning“ zeigte erstmalig experimentell auf, dass Schwammsymbionten aus dem Schwamm in das umgebende Meerwasser gelangen können. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der „presence vs. activity“-Vergleich zur Feststellung der metabolischen Aktivität von Bakterien auf die DGGE-Methode übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten mikrobiellen Symbionten im Adult-Schwamm, Embryo- sowie Larvalstadium metabolisch aktiv waren. Erste Versuche die Anzahl von Symbionten in den Larven von *E. ferox* mittels Antibiotika zu reduzieren, verliefen positiv. So wiesen die mit Antibiotika behandelten Larven in der DGGE eine deutliche Reduzierung der Bandenintensität auf. Die Verfügbarkeit aller reproduktiver Stadien von *E. ferox* sowie die Möglichkeit die Larven im Labor experimentell zu manipulieren, machen *E. ferox* zu einem geeigneten Modellschwamm für zukünftige Studien bezüglich der vertikalen Weitergabe von Symbionten.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, neue Erkenntnisse über die Mikrobiologie der LMA-Schwamm Gattung *Oscarella* zu gewinnen. Hierzu wurden die mikrobiellen

Zusammenfassung

Konsortien verschiedener *Oscarella*-Arten verglichen, sowie die mikrobiellen Gemeinschaften der unterschiedlichen Farbvariationen von *Oscarella lobularis* und verschiedener Standorte untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass jede der fünf *Oscarella*-Arten eine unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaft zu besitzen scheint. Die erstellten DGGE-Profile wiesen außerdem ein für LMA-Schwämme typisches bakterielles Profil mit geringer Bandenzahl und niedrigem GC-Gehalt auf. Dies wurde weiter durch die Erstellung einer 16S rRNA Genbank von *O. lobularis* bestätigt, die eine geringe mikrobielle Diversität auf Phylum-Ebene und eine Dominanz der Alpha-Proteobacteria zeigte. Die DGGE-Profile der fünf verschiedenen Farbvariationen, sowie die aus unterschiedlichen Tiefen und Standorten sprechen zusätzlich für eine artspezifische mikrobielle Gemeinschaft in *O. lobularis* unabhängig von Farbe oder Standort.

Das dritte Projekt hatte zum Ziel, karibische Schwämme anhand ihrer Bakterienhaltigkeit in „high microbial abundance“ (HMA) oder „low microbial abundance“ (LMA) Schwämme einzuordnen. Mittels DAPI-Färbung, DGGE und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden hierfür 23 karibische Schwämme untersucht. Dabei erwies sich die TEM als zuverlässigste Methode zur Bestimmung der Bakterienhaltigkeit von Schwämmen. Die DAPI-Färbung stellt eine weitere gute Methode dar, um einen ersten Eindruck über die bakterielle Abundanz zu liefern, wohingegen die DGGE nur im direkten Vergleich mit einem schon bekannten HMA- bzw. LMA-Schwamm sinnvoll erscheint. Von denen hier untersuchten 23 Schwämmen konnten insgesamt sechs den LMA- und neun den HMA-Schwämmen zugeordnet werden. Das Muster, dass innerhalb einer Gattung alle Schwämme entweder LMA oder HMA-Schwämme sind, lässt sich nur auf einige der hier untersuchten Familien oder Ordnungen übertragen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erlauben einen tieferen Einblick in die Zusammensetzung, Art der Weitergabe, metabolische Aktivität und experimentelle Möglichkeiten der Manipulation der mikrobiellen Gemeinschaft des karibischen Modellschwammes *Ectyoplasia ferox*. Des Weiteren wurden hier erstmalig die mikrobiellen Konsortien verschiedener *Oscarella*-Arten mittels DGGE beschrieben und verglichen, was zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft unter besonderer Betrachtung von Standortfaktoren führte. Die abschließenden Untersuchungen zur Bakterienhaltigkeit karibischer Schwämme lässt auf Grund der Beobachtung, dass manche Gattungen und Familien

ausschließlich aus HMA- oder LMA-Schwämmen bestehen, eine Korrelation zwischen Bakterienhaltigkeit und Wirtsphylogenie erahnen. Jedoch sollten noch deutlich mehr Schwammarten untersucht werden um konkrete Aussagen treffen zu können.

1 Abstract

Marine sponges (Phylum: Porifera) first appeared during Precambrian times 580 million years ago and are therefore the oldest metazoans on earth. It is most likely that they are living together in symbiosis with microorganisms from that day on. In this doctoral thesis I introduce the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox* as a model system for detailed investigations of the sponge associated microbial community, their mode of transmission to the next generation and interactions with their host sponge. The application of 16S rRNA gene clone libraries and denaturing gradient gel electrophoreses (DGGE) revealed that symbionts from six out of eight bacterial phyla as well as the ‘sponge-associated unclassified lineage’ (SAUL) were vertically transmitted to the next sponge generation. Phylogenetic analysis identified 21 vertical transmission (VT) clusters, from which 19 VT-clusters were affiliated with sponge-specific clusters (SSC) and sponge-coral clusters (SCC), respectively. This indicated that the majority of the microbial consortia of *E. ferox* has been passed on vertically via reproductive stages to the next generation. Furthermore two cyanobacterial clades were identified, which were absent from the reproductive stages and therefore seem to have been acquired horizontally from the surrounding seawater. Spawning led to a reduction of 50% of the sponge symbionts in the mesohyl, presenting for the first time experimental evidence, as to how sponge symbionts could end up in surrounding seawater. Moreover the presence vs. activity comparison that was undertaken to assess the metabolic activity of bacteria inside reproductive stages has been applied to DGGE for the first time. The results showed that most of the symbionts were metabolically active in the adult sponge as well as in the embryos and larvae. Initial experiments to reduce the amount of symbiotic bacteria inside larvae were positive. In the antibiotic treated larvae, the DGGE pattern showed a significantly reduced banding pattern intensity. The availability of *E. ferox* and its reproductive stages, as well as the possibility to maintain and to manipulate larvae in the laboratory makes *E. ferox* a suitable model-system for future research on vertical transmission.

Zusammenfassung

Furthermore this dissertation thesis provides new insights into the microbiology of *Oscarella* LMA-sponges. Therefore the microbial consortia of five different *Oscarella* species were investigated with respect to different color morphs of *Oscarella lobularis* as well as the influence of its geographic location. The results indicated that the different *Oscarella* species harbor distinct microbial communities. Moreover the DGGE banding pattern revealed a bacterial profile typical for LMA-sponges, that comprises a low number of bands and low GC-contents. A 16S rRNA gene clone library confirmed these findings and showed a low phylum-level diversity with dominance in Alpha-Proteobacteria. The DGGE-profile of the five different color morphs, as well as the profiles from different locations and depths, suggested a species-specific microbial community in *O. lobularis* independent of sponge color and location.

Another main focus of this thesis was the classification of sponges into high microbial abundance (HMA) and low microbial abundance (LMA) sponges. For this project a total of 23 Caribbean sponges were investigated with respect to their microbial abundance using DAPI-staining, DGGE and transmission electron microscopy (TEM). While TEM proved to be the most reliable method to determine the amount of bacteria within the sponge mesohyl, DAPI-staining represented a quick possibility to investigate microbial abundance in sponges. By contrast DGGE appeared only useful in direct comparison with known HMA- or LMA-sponges. Six of the investigated 23 Caribbean sponges could be assigned to LMA-sponges, while nine of them were identified as HMA-sponges. The pattern that within some genera all sponges belong either to LMA- or HMA-sponges could only be assigned to some families and orders.

The results presented in this work allow deeper insights into the composition, mode of transmission, metabolic activity and experimental tractability of manipulating the microbial community of the Caribbean model-sponge *Ectyoplasia ferox*. Furthermore, the microbial communities of five *Oscarella* species were described, including different color morphs and from different locations. They revealed a dominance of Alpha-Proteobacteria in these LMA-sponges without any influence of the location or depth on the microbial communities within them. The analysis of different Caribbean sponges regarding their microbial abundance revealed the pattern for some genera to contain exclusively only LMA- or HMA-sponges.

Zusammenfassung

Therefore many more sponges also from different geographical regions should be investigated in the future to determine, if these pattern can be assigned to family and order levels, too.

2 Einleitung

2.1 Phylum Porifera

Schwämme (Phylum: Porifera) stellen die ältesten rezenten Vertreter der Metazoen dar. Dies belegen fossile Funde, die das evolutionäre Alter der Schwämme auf ca. 580 Millionen Jahre datieren (Li *et al.* 1998). Phylogenetische Berechnungen, denen Mutationsraten in Proteinsequenzen zugrunde liegen, schätzen Schwämme dagegen mit 1.351 Millionen Jahren deutlich älter ein (Hughes *et al.* 2001). Neuere Untersuchungen von Love und Kollegen, bei denen der Hornkieselschwamm-spezifischen Biomarkers 24-Isopropylcholestan verwendet wurde, konnten zeigen, dass Schwämme schon vor 635-750 Millionen Jahren vorkamen (Love *et al.* 2009). Damit bewiesen sie, dass Schwämme die Erde schon lange vor der kambrischen Radiation (520-530 Mio. Jahren) besiedelten. Heute findet man Schwämme in allen aquatischen Lebensbereichen von den kalten, polaren Zonen der Ozeane über die Tiefsee und subtropischen sowie tropischen Riffen, in denen die Diversität an Schwammarten am höchsten ist, bis hin zu Seen und Flüssen.

2.1.1 Taxonomie

Schwämme wurden auf Grund ihres einheitlichen Körperbaus erst 1755 (Ellis) bzw. 1766 (Pallas) dem Reich der Animalia zugeordnet und es dauerte nochmal ein gutes Jahrhundert, bis Schwämme im *Zoological Record* von 1872 in einer eigenen Klasse, den Spongozoa, zusammengefasst wurden (Hooper und van Soest 2002). Heute schätzt man das Phylum Porifera auf ca. 20.000 Arten, von denen 8.553 taxonomisch beschrieben sind (van Soest *et al.* 2012). Sie wurden bisher anhand der Formen der Skelettnadeln (Spiculae) sowie der Zellmorphologie und Embryologie in die folgenden drei Klassen eingeteilt: Calcarea (Kalkschwämme), Hexactinellida (Glasschwämme) und Demospongiae (Hornkieselschwämme), wobei letztere Klasse 83% aller beschriebenen Schwammarten beinhaltet (Hooper und van Soest 2002; van Soest *et al.* 2012). Neueste Studien bei denen phylogenetische Marker wie das 18S rRNA-Gen, 28S rRNA-Gen bzw. das mitochondrielle Cytochrom Oxidase 1 Gen (COI) zur Klassifizierung herangezogen wurden, kamen zu dem Ergebnis, dass die bisherige Unterklasse der Demospongiae, die Homoscleromorpha (Kieselschwämme), evolutionär soweit von diesen

Einleitung

entfernt ist, dass sie nun offiziell die vierte Klasse der Porifera darstellt (Gazave *et al.* 2010, 2012).

2.1.2 Morphologie und Lebensweise

Marine Schwämme zeichnen sich unter anderem durch ihre hohe Farben- und Formenvielfalt aus. So gibt es vasenförmige Schwämme, solche die sich in einer nur wenigen Millimeter dicken Schicht über das Substrat ziehen (inkrustierende Schwämme), sowie amorphe Wuchsform oder solche, die sich verzweigen (Abb. 2.1). Was Schwämme jedoch bis auf wenige

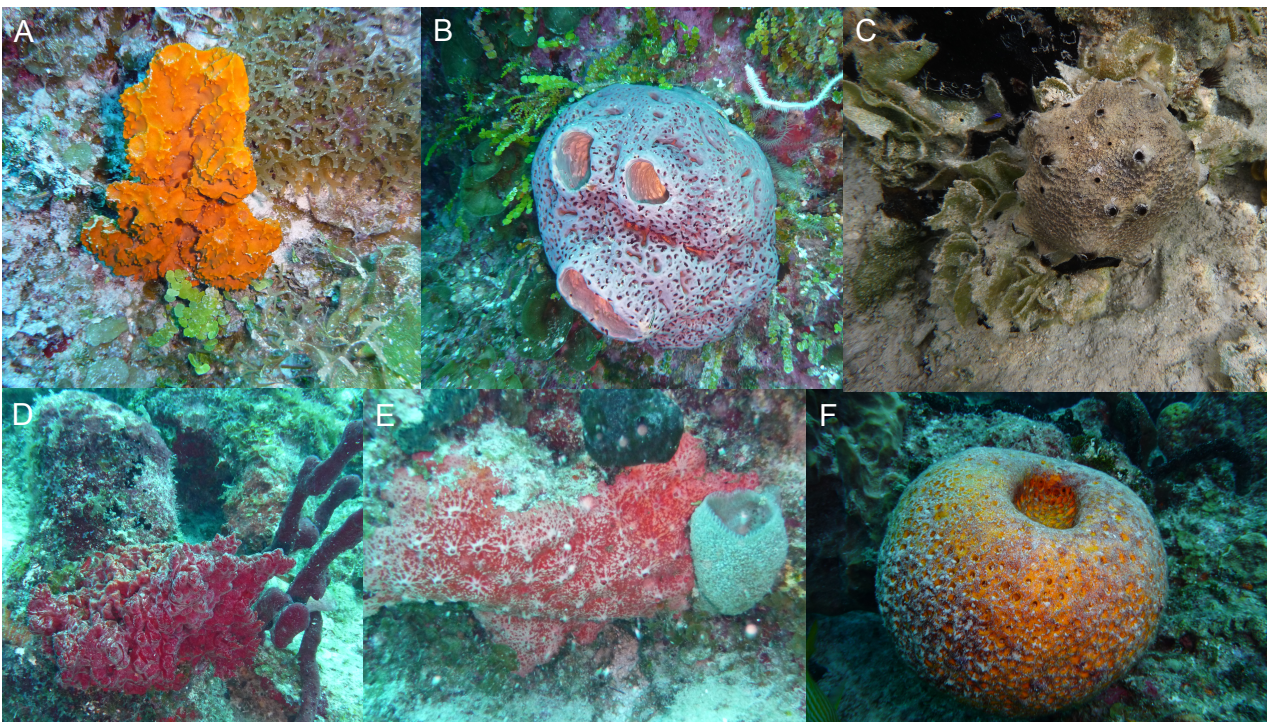


Abb. 2.1: Verschiedene Wuchsformen der Klasse Demospongiae: A=nicht identifizierter Schwamm, B=nicht identifizierter Schwamm, C=*Ircinia felix*, D=*Monanchora arbuscula*, E=*Monanchora barbadensis*, F=*Cinachyra alloclada*. Fotos: Volker Glöckner.

Ausnahmen alle gemeinsam haben, ist ihre sessile Lebensweise, ihr einfacher Bauplan (Bergquist 1978) und ihre Nahrungsaufnahme durch Filtration (Reiswig 1971). Schwämme besitzen keine echten Gewebe, Organe, Nervenzellen oder Blutgefäße. Vielmehr unterscheidet man bei Schwämmen zwischen einer äußeren Zellschicht, dem Pinacoderm, und einer inneren Zellschicht, dem Choanoderm. Zwischen diesen liegt das Mesohyl, eine Art extrazelluläre Matrix, in die verschiedene Zelltypen, wie die totipotenten Archeozyten eingebettet sind. Zur Stabilisierung des Schwammgewebes dient ein Skelett aus Spiculae bzw. aus Sponginfasern. Die sessile Lebensweise hat zur Folge, dass sich Schwämme durch Filtration des umgebenden

Einleitung

Wassers ernähren. Hierbei strudeln sie Wasser durch die Dermalporen (Ostia) an der Schwammoberfläche in ein das Schwammgewebe durchziehendes System aus wasserführenden Kanälen. Je nach Verzweigungsgrad des Kanalsystems wird zwischen drei verschiedenen Organisationstypen unterschieden, dem Ascon-, Sycon- und Leucontyp (Abb. 2.2).

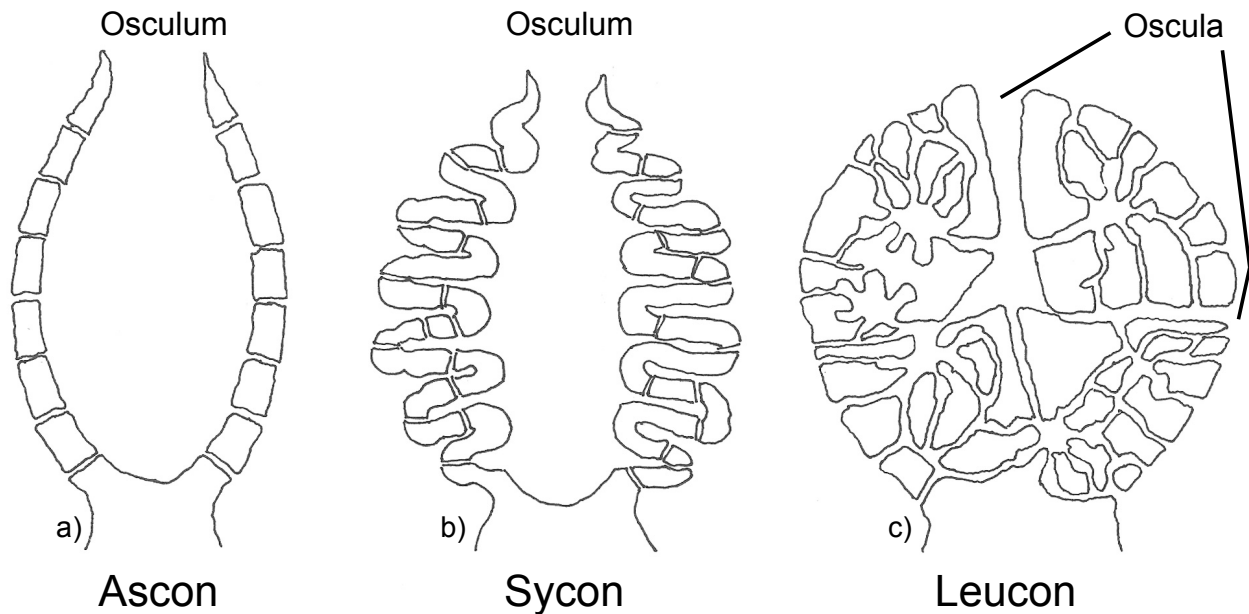


Abb. 2.2: Die drei verschiedenen Systeme der Wasserkanalverzeigung in der Klasse der Demospongiae, a) Ascon-, b) Sycon- und c) Leucon-Typ. Abbildung: Volker Glöckner.

Die Wasserkanäle führen zu sogenannten Choanazytenkammern, in denen sich die Kragengeißelzellen (Choanocyten) befinden. Diese sind nicht nur für den kontinuierlichen Wasserstrom durch das Kanalsystem verantwortlich, sondern filtern auch Nahrungspartikel wie Mikroorganismen, Algen und Detritus aus dem umgebenden Wasser. Diese werden dann entweder von den Choanazyten vorverdaut oder direkt zur Verdauung an die im Mesohyl befindlichen Archeozyten weitergegeben (Brusca und Brusca 1990). Nachdem das Wasser die Choanacytenkammern passiert hat, strömt es durch die Austrittsöffnungen (Osculi) wieder aus (Abb. 2.3).

Marine Schwämme haben eine enorme Filtrierleistung, die mehrere tausend Liter Meerwasser pro Tag und Kilogramm Schwammgewebe betragen kann und durch die sie ihren Sauerstoff und Energiebedarf decken (Reiswig 1974, Vogel 1977, Pile und Young 2006, Leys *et al.* 2011, Ribes *et al.* 1999). Das durch die Osculi austretende Meerwasser ist danach praktisch steril (Wehrl *et al.* 2007).

Einleitung

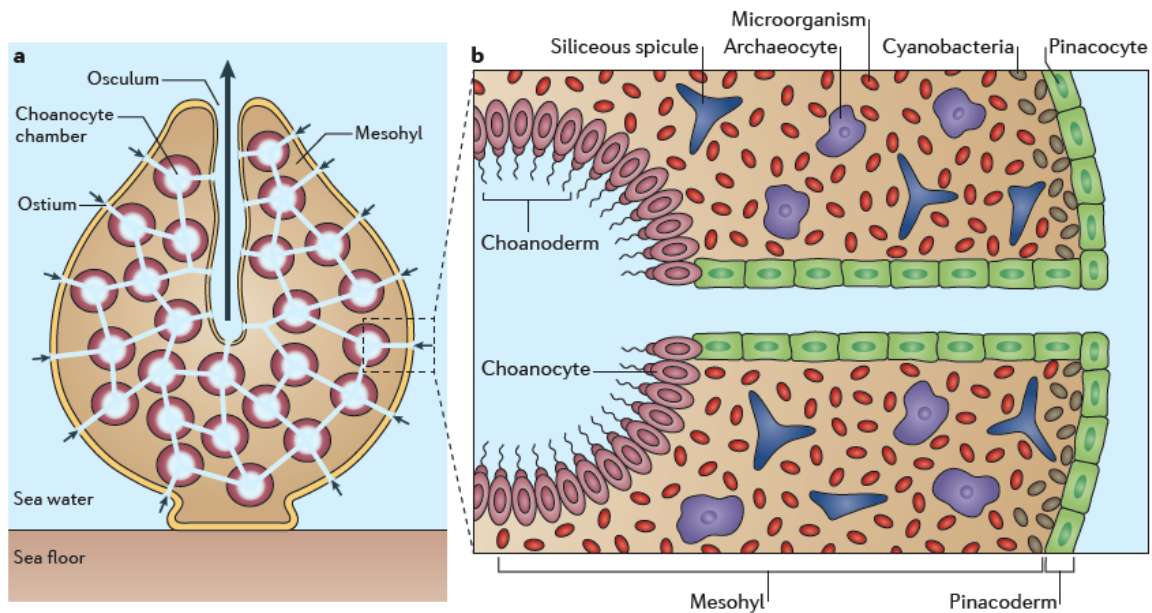


Abb. 2.3: a) Schema eines Schwammes des Leucon Typs, (b) schematischer Querschnitt durch den Schwammkörper. Abbildung aus Hentschel *et al.* (2012).

Da Schwämme auf Grund ihrer sessilen Lebensweise nicht vor ihren Fressfeinden flüchten können, mussten sie neue Verteidigungsstrategien entwickeln. Spiculae oder die Beschaffenheit des Schwammgewebes können nur bedingt als physiologische Abwehrmaßnahme angesehen werden (Chanas und Pawlik 1995). So verteidigen sich Schwämme mit einer Vielzahl an bioaktiven Substanzen z. B. vor Fressfeinden, konkurrierenden Schwämmen, Infektionen oder Überwucherung durch andere Rifforganismen. Viele dieser bioaktiven Substanzen bergen auf Grund ihrer chemischen Struktur ein großes biotechnologisches und medizinisches Potential. Das Krebsmedikament Cytosar-U und das antivirale Medikament Vira-A gehen beide auf Sekundärmetabolite des Schwammes *Tethya* sp. zurück (Mayer *et al.* 2010). Alleine 2008 wurden 278 neue Sekundärmetabolite in Schwämmen entdeckt (Blunt *et al.* 2010). Auch die Sekundärmetabolite von Schwamm-assoziierten Bakterien erwiesen sich als außerordentlich vielversprechend hinsichtlich ihres biotechnologischen und medizinischen Potentials (Newman und Cragg 2004, Wijffels 2008, Pimentel-Elardo *et al.* 2009, Tabares *et al.* 2012, Abdelmohsen *et al.* 2012).

Die Fortpflanzung von Schwämmen, die Entstehung der Gameten sowie die larvale Entwicklung und Metamorphose zu Juvenil-Schwämmen kann über verschiedene Prozesse ablaufen. Hinsichtlich der Fortpflanzung lässt sich grundsätzlich feststellen, dass diese sowohl auf sexuellem wie auch auf asexuellem Wege verlaufen kann. Die Gametogenese findet dabei ent-

Einleitung

weder getrennt-geschlechtlich oder zwei-geschlechtlich (kontemporärer oder sukzessiver Hermaphroditismus) statt (Maldonado und Riesgo 2008). Mehrere Studien zeigten allerdings, dass getrennt-geschlechtliche Schwammpopulationen auch einen geringen Anteil an sukzessiv zwei-geschlechtlichen Individuen beherbergen können (Elvin 1976, Lepore *et al.* 2000, Baldaconi *et al.* 2007). Schwämme können entweder vivipar oder ovipar sein (Ereskovsky 2010). Bei viviparen Schwämmen kommt es zu einer internen Befruchtung, wonach sich die Embryonen im Mesohyl zu frei-schwimmenden Larven, die den Adult-Schwamm über die Wasserkanäle verlassen, entwickeln. Bei oviparen Schwämmen kann die Befruchtung sowohl intern als auch extern stattfinden. Bei einer externen Befruchtung kommt es zu einem synchronisierten Ausstoß von männlichen und weiblichen Gameten (Hoppe und Reichert 1987, Maldonado und Riesgo 2009). Die embryonale Entwicklung findet hier außerhalb des Adult-Schwammes im umgebenden Meerwasser statt. Die nach dem Embryonalstadium schlüpfenden Schwamm-Larven verbringen eine unbestimmte Zeit frei-schwimmend in der Wassersäule, bevor sie negativ phototaxisch reagieren (Collin *et al.* 2010, Abdul Wahab *et al.* 2011) und sich am Substrat anheften, wo sie sich nach einer Metamorphose zu Juvenil-Schwämmen entwickeln.

Neben der sexuellen Fortpflanzung besteht für Schwämme noch die Möglichkeit der asexuellen Fortpflanzung. Diese entsteht zumeist durch die Formierung von Gemmulae, Knospung oder durch eine Fragmentierung des Adult-Schwammes durch Stürme oder Fressfeinde (Ereskovsky 2010).

Der zeitliche Ablauf der Fortpflanzung und Entwicklung mariner Invertebraten unterliegt zahlreichen biotischen und abiotischen Faktoren. So ist bekannt, dass verschiedene Umwelteinflüsse wie ausreichendes Vorhandensein von Nahrung, Meereshydrodynamik und Biomechanik (Ereskovsky 2010) sowie die Wassertemperatur die Schwammreproduktion entscheidend beeinflussen (Elvin 1976, Ettinger-Epstein *et al.* 2007, Piscitelli *et al.* 2011). Dies macht es extrem schwierig den Zeitpunkt des „*spawning*“ vorherzusagen und reproduktives Schwammmaterial für Untersuchungen und Experimente sicherzustellen.

2.2 Schwämme und ihre assoziierten mikrobiellen Konsortien

2.2.1 Das Konzept der HMA- und LMA-Schwämme

Schon früh entdeckte man bei elektronenmikroskopischen Studien, dass Schwämme mit Mikroorganismen (Lévi und Porte 1962, Vacelet 1970, 1971, 1975), die frei im Mesohyl, aber auch intrazellulär oder intranuklear liegen können (Vacelet 1970, Wilkinson 1978a, Friedrich *et al.* 1999) (Vacelet 1970, Wilkinson 1978a, Friedrich *et al.* 1999), assoziiert sind (Lévi und Porte 1962, Vacelet 1970, 1971, 1975). Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass es Unterschiede in der mikrobiellen Abundanz zwischen verschiedenen Schwammarten gibt (Reiswig 1974, Wilkinson 1978c). So wurde für Schwämme mit einer großen Anzahl an Mikroorganismen der Begriff „*bacteriosponges*“ geprägt, für Schwämme mit wenig Mikroorganismen dementsprechend „*nonsymbiont-harbouring, normal sponges*“ (Reiswig 1981). Heute spricht man in diesem Zusammenhang von „*high microbial abundance*“ (HMA) Schwämmen bzw. „*low microbial abundance*“ (LMA) Schwämmen (Hentschel *et al.* 2003). Ein HMA-Schwamm kann bis zu 10^{10} Mikroorganismen pro Milliliter Schwammgewebe enthalten (Reiswig 1981), welche damit bis zu 35% der Schwammbiomasse ausmachen können (Vace-

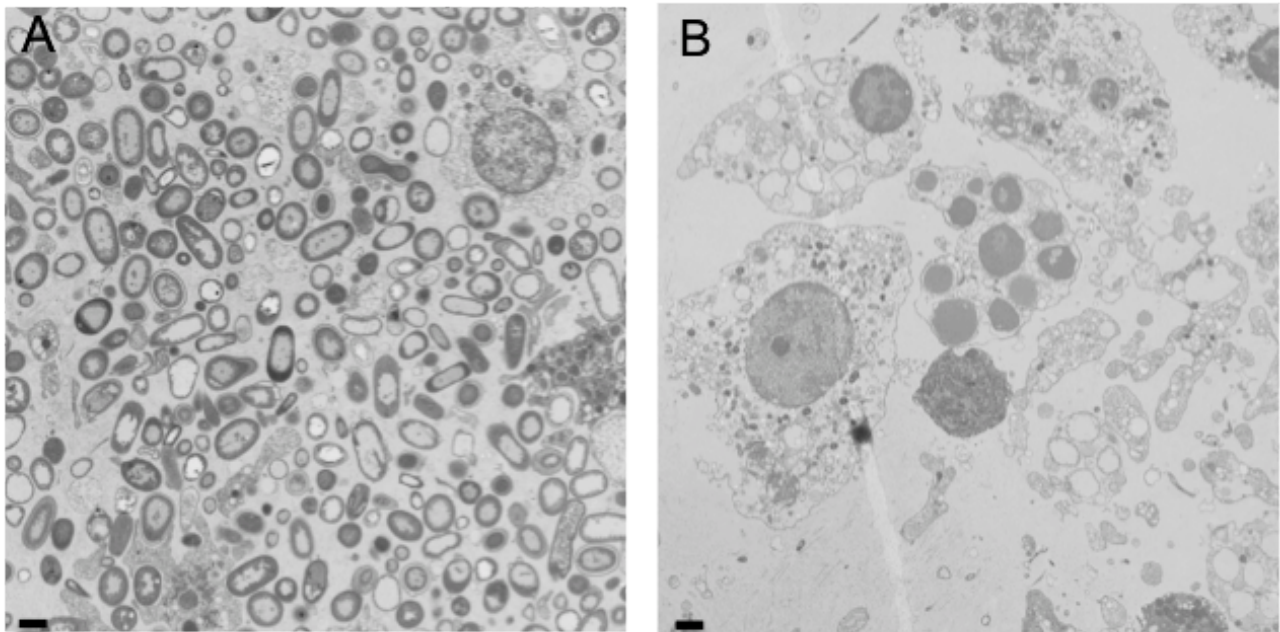


Abb. 2.4: TEM Aufnahme des HMA Schwammes *Aplysina fistularis* (A) und des LMA Schwammes *Bazella rubra* (B). Massstab entspricht 1 μm . TEM-Aufnahmen: Volker Glöckner.

Einleitung

let 1975). Nach der Definition von Hentschel *et al.* (2006) liegt die Anzahl an Mikroorganismen für HMA-Schwämme zwischen 10^8 und 10^{10} Mikroorganismen pro Gramm Schwammgewebe und damit zwei- bis vierfach höher als bei LMA-Schwämmen, die gerade mal 10^5 - 10^6 Mikroorganismen pro Gramm Schwammgewebe beinhielten, was äquivalent zu der Anzahl an Mikroorganismen im umgebenden Meerwasser ist (Hentschel *et al.* 2006).

HMA- und LMA-Schwämme unterscheiden sich jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer mikrobiellen Abundanz, sondern auch hinsichtlich ihrer mikrobiellen Diversität. So konnte mittels TEM, DGGE, Klon-Banken und Ampliconsequenzierungen (Schmitt *et al.* 2011a) gezeigt werden, dass LMA-Schwämme eine deutlich geringere Diversität an Mikroorganismen aufweisen als Vertreter der HMA-Schwämme (Weisz *et al.* 2007, Kamke *et al.* 2010, Schmitt *et al.* 2011a, Gloeckner *et al.* 2012a, Gloeckner *et al.* 2012b).

2.2.2 Mikrobielle Diversität

Die mit Schwämmen assoziierten Mikroorganismen können nicht nur in hoher Abundanz sondern auch in enormer Diversität vorliegen. Die phylogenetische Komplexität mikrobieller Konsortien in Schwämmen wurde allerdings erst mit der Einführung kultivierungsunabhängiger Methoden deutlich. Das Problem bei kultivierungsabhängigen Methoden ist weiterhin, dass 99% der vorhandenen Mikroorganismen nicht kultivierbar sind (Amann *et al.* 1995). Durch die Entdeckung des 16S rRNA Gens als phylogenetischen Marker (Ludwig und Schleifer 1994) für Mikroorganismen und die stetige Verbesserung der Sequenziermethoden zeigt sich uns heute eine enorme Vielfalt an Schwamm-assoziierten Mikroorganismen.

Kannte man 2002 gerade einmal neun Phyla Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen (Hentschel *et al.* 2002), so waren es 2007 schon 16 Phyla sowie die beiden Hauptabstammungslinien der Archaea, die Crenarcheota und Euryarcheota (Taylor *et al.* 2007). Mit Hilfe der 454 Sequenzierungen konnten dann auch Bakterien erfasst werden, die in weitaus geringerer Abundanz („rare biosphere“ (Sogin *et al.* 2006)) im Schwamm vorlagen, was 2010 zur Beschreibung von 23 bakteriellen Phyla führte (Webster *et al.* 2010). Bis heute wurden anhand des 16S rRNA Gens insgesamt 32 bakterielle Phyla sowie die zwei Hauptlinien der Archaea (Thaumarchaeota und Euryarchaeota) in Schwämmen identifiziert (Schmitt *et al.* 2011a, Hentschel *et al.* 2012), wovon 18 taxonomisch beschrieben sind, namentlich die Verruco-

Einleitung

microbia, Lentisphaerae, Chlamydiae, Planctomycetes, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Bacteroidetes, Caldithrix-Deferribacteres, Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Proteobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Spirochaetes, Chloroflexi, Armatimonadetes, Deinococcus-Thermus, und neun sogenannte Candidatus Phyla. Die Bezeichnung „Candidatus“ tragen alle prokaryotischen Phyla, von denen zwar 16S rRNA Gensequenzen bekannt sind, es allerdings noch nicht gelungen ist einen Vertreter zu kultivieren und damit auch nicht morphologisch beschrieben werden können. Die Candidatus Phyla sind OP3, das Candidatus Phylum Poribacteria (Fieseler *et al.* 2004, Lafi *et al.* 2009), das bis heute fast ausschließlich aus Schwämmen isoliert wurde, BRC1, TM6, TM7, OP11, OD1, BD1-5 sowie OP1. Offiziell noch nicht als Candidatus Phylum aufgenommen, hier aber der Vollständigkeit halber erwähnt, ist die erst kürzlich entdeckte „*sponge-associated unclassified lineage*“ (SAUL) (Schmitt *et al.* 2011a). Berücksichtigt man zusätzlich die Daten aus der 454 Sequenzierungsstudie von Schmitt *et al.* (2011a), so kommen nochmals vier Candidatus Phyla, CAB-I, OP10, OS-K und SBR1093 (Schmitt *et al.* 2011a) hinzu. Die häufigsten Vertreter der nun insgesamt 32 Schwamm assoziierten bakteriellen Phyla gehören zu den Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Acidobacteria, Nitrospirae sowie zu dem Candidatus Phylum Poribacteria (Hentschel *et al.* 2012).

Die meisten aus Schwämmen isolierten bakteriellen 16S rRNA Gene formen in phylogenetischen Analysen sogenannte Schwamm-spezifische Cluster. Ein monophyletisches Schwamm-spezifisches Cluster ist als eine Gruppe von mindestens drei 16S rRNA Gen-Sequenzen definiert, die aus verschiedenen Schwammarten und/oder aus verschiedenen geografischen Regionen isoliert wurden, die zueinander ähnlicher sind als zu 16S rRNA Gen-Sequenzen, die aus sonstigen Umweltproben isoliert wurden, und die unabhängig von der verwendeten Baumrechnungsmethode Cluster bilden (Hentschel *et al.* 2002). Auch wenn im Zuge verbesserter Methoden manche dieser 16S rRNA Gen-Sequenzen in sehr geringer Abundanz aus dem umgebenden Meerwasser isoliert werden konnten (Webster *et al.* 2010), werden sie im Folgenden als (Schwamm-) Symbionten bezeichnet. Hierbei wird die Definition des deutschen Naturwissenschaftlers Anton de Bary (1879) angewandt, die lediglich das Zusammenleben unterschiedlicher Organismen über einen größeren Zeitraum in derselben Umgebung beschreibt.

Einleitung

2.2.3 Mögliche Interaktionen zwischen Schwämmen und ihren Symbionten

Das Wort Symbiose leitet sich aus dem Altgriechischen „symbiōsis“ ab und bedeutet „Zusammenleben“. Verwendet man die von Anton de Bary 1879 eingeführte Definition von Symbiose, so leben Schwämme und ihre assoziierten Mikroorganismen in einer solchen ohne dabei eine Wertung hinsichtlich der Abhängigkeit der in Symbiose lebenden Organismen abzugeben. Generell kann es sich bei einer Symbiose um Mutualismus (Vorteile für beide Partner), Kommensalismus (Vorteile nur für einen Partner ohne Nachteile für den anderen) oder Parasitismus (Vorteile nur für einen Partner, Nachteile für den anderen) handeln.

In der Literatur zu Schwämmen und ihren assoziierten Mikroorganismen hinsichtlich möglicher Symbioseformen finden sich kaum Hinweise auf einen echten Mutualismus zwischen dem Wirt (Schwamm) und seinen Symbionten (hier Mikroorganismen), wohingegen Beispiele für Kommensalismus häufiger sind. So wird vermutet, dass der Schwamm für die Bakterien ein stabiles und schützendes Habitat vor schädlichen Umwelteinflüssen wie Fressfeinden oder zu großer Lichteinstrahlung darstellt (Sarà 1971, Osinga *et al.* 2001, Hentschel *et al.* 2006). Ein weiterer Vorteil für die Symbionten könnte das Bereitstellen von stickstoffhaltigen Stoffwechselprodukten sein, die von Crenarchaeota und Nitrosospira zu Nitrat oxidiert werden (Bayer *et al.* 2007).

Seitens der Symbionten konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass Cyanobakterien Assimilate an den Wirt abgeben (Vacelet 1971) und mit Wirtszellen interagieren (Erwin *et al.* 2012b). Vergleicht man in diesem Zusammenhang Cyanobakterienhaltige mit Cyanobakterien-freien Schwämmen so fällt auf, dass Cyanobakterienhaltige eine deutlich geringere Filtrationsleistung zeigen, was annehmen lässt, dass sie einen Teil ihres Energiebedarfs mittels der cyanobakteriellen-Assimilate decken (Wilkinson *et al.* 1988). Verdunklungsexperimente an Schwämmen mit und ohne Cyanobakterien bestätigen diese Annahme (Freeman und Thacker 2011). So zeigten Cyanobakterienhaltige Schwämme unter Verdunklung eine weitaus geringere Wachstumsrate gekoppelt mit geringeren Konzentrationen von Chlorophyll a als unter Lichteinfluss bzw. als Schwämme ohne Cyanobakterien, deren Isotopenwerte darauf schließen lassen, dass sie ihren Energiebedarf zum größten Teil durch Filtration decken (Freeman und Thacker 2011). Als ein weiterer rein hypothetischer Vorteil der Cyanobakterien für den Schwamm wird diskutiert, ob die Absorption von UV-

Einleitung

Strahlung der cyanobakteriellen Chlorophylle und Mycosporin-ähnlichen Aminosäuren nicht eine Art Sonnenschutz für den Schwamm darstellt (Sarà 1971, Bandaranayake *et al.* 1996, Shick und Dunlap 2002). Der Schwamm profitiert aber nicht nur von Cyanobakterien sondern zusätzlich auch von anderen mikrobiellen Symbionten. So besagen weitere Hypothesen, dass die gesteigerte Mucus Produktion der Bakterien die strukturelle Festigkeit des Schwammgewebes (Wilkinson 1978b) erhöhen würde und die Bakterien beim Verdau und der Wiederverwertung von unlöslichen Schwammkollagenfasern helfen könnten (Wilkinson und Garrone 1980). Eine wichtige Rolle für den Schwamm spielen ohne Zweifel die von Bakterien bereitgestellten Sekundärmetabolite zum Schutz vor Überwucherung, Fraßfeinden und Pathogenen (Unson *et al.* 1994, Schmidt *et al.* 2000, Hentschel *et al.* 2001, Chelossi *et al.* 2004, Lee und Qian 2004).

Abschließend sollen, nachdem sich die Berichte über Schwammkrankheiten in den letzten Jahren mehren (Webster *et al.* 2002, Olson *et al.* 2006, Maldonado *et al.* 2010, Luter *et al.* 2010, Angermeier *et al.* 2011, Angermeier *et al.* 2012,) die Infektionen durch bakterielle Pathogene nicht unerwähnt bleiben. Leider ist bei den meisten Schwammkrankheiten schwer nachzuweisen wer oder was diese auslöst. Webster und Kollegen konnten erstmals ein Sponggin zersetzendes Alpha-Proteobacterium (strain NW4327) isolieren, welches bei dem im Great Barrier Reef vorkommenden Schwamm *Rhopaloeides odorabile* schwere Gewebenekrosen verursachte (Webster *et al.* 2002). Ein ähnliches Krankheitsbild wurde bei einzelnen Individuen (bis zu 20% der Population) des karibischen Schwammes *Amphimedon compressa* beobachtet, aus dessen nekrotischen Gewebe ein weiteres Alpha-Proteobacterium (strain HA007) isoliert werden konnte. Mit einer Sequenz-Übereinstimmung von 99,4% weist dieses eine hohe Ähnlichkeit zu dem Sponggin-zersetzenden Alpha-Proteobacterium strain NW4327 auf. Die Autoren vermuten deshalb, dass HA007 die Gewebenekrosen bei *Amphimedon compressa* verursacht, auch wenn dies nicht durch die Erfüllung der Koch'schen Postulate bestätigt werden konnte (Angermeier *et al.* 2012).

Einleitung

2.2.4 Vertikale Weitergabe vs. horizontale Aufnahme von Schwamm-Symbionten

Die mikrobiellen Konsortien mariner Schwämme sind auch über große geografische Distanzen hinweg relativ konstant (Hentschel *et al.* 2002). Dies wirft jedoch die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus auf, der es den Schwämmen ermöglicht ihre mikrobiellen Konsortien weiterzugeben oder aus dem umgebenden Meerwasser aufzunehmen. Hierfür gibt es prinzipiell zwei Strategien. Die erste ist die der vertikalen Weitergabe von Schwammsymbionten über die Gameten, wie die Embryonen oder Larven, an die nächste Schwammgeneration. Die zweite Strategie ist die der horizontalen Aufnahme von Symbionten aus dem umgebenden Meerwasser (Abb. 2.5).

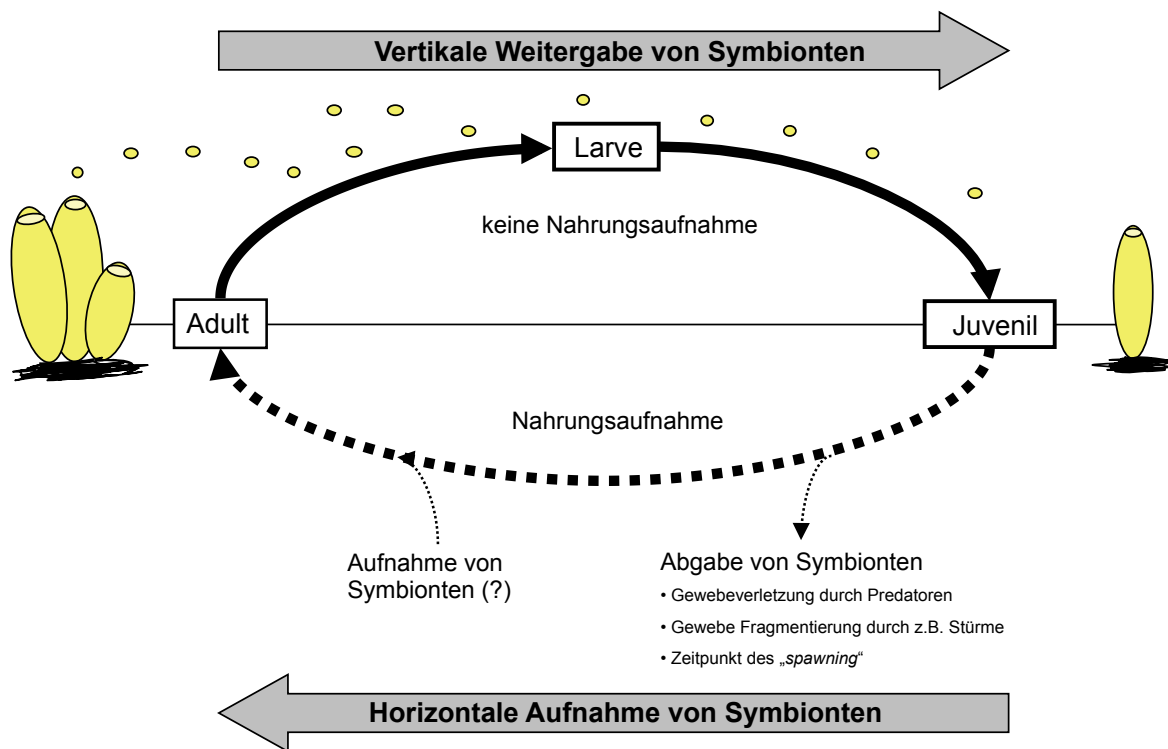


Abb. 2.5: Schema zur vertikalen Weitergabe bzw. horizontalen Aufnahme von Symbionten. Modifiziert nach Schmitt *et al.* (2008).

Bei den meisten durch vertikale Weitergabe aufrechterhaltenen Symbiosen ist die Assoziation mit den Symbionten permanent, was bedeutet, dass es im Gegensatz zur horizontalen Aufnahme von Symbionten keine aposymbiotische Phase im Lebenszyklus des Wirtes gibt. Die ausgewählten Symbionten werden dabei ausschließlich über die weibliche Keimlinie an die nächste Generation weitergegeben (Bright und Bulgheresi 2010), wobei es auch hier Ausnahmen wie den Schwamm *Chondrilla australiensis* gibt, dessen Symbiont etwa in 2% der männlichen Keimlinie zu finden sind (Usher *et al.* 2005). Bei Blattläusen führt die permanente Lebens-

Einleitung

weise zusammen mit dem Wirt und die strikt vertikale Weitergabe der Symbionten auf Dauer zu einer Anhäufung von Mutationen im genetischen Repertoire der Symbionten und letztendlich zum Verlust von Genen, die zum Überleben außerhalb des Wirtes nötig wären (Bright und Bulgheresi 2010).

Für horizontal aufgenommene Symbionten ist das Zusammenleben mit einem Wirt dagegen nur fakultativ, da sie auch ohne den Wirt in der Umwelt überleben können, während der zunächst aposymbiontische Wirt auf diese angewiesen ist (Bright und Bulgheresi 2010). Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Symbiose zwischen dem Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* und dem Tintenfisch *Euprymna scolopes*. Jede neue Generation (Wirtsgeneration) von *Euprymna scolopes* muss im Juvenil-Stadium den Symbionten initial aus dem umgebenden Meerwasser aufnehmen um sein Leuchtorgan mit diesem zu kolonisieren (Nyholm und McFall-Ngai 2004). Beim Vergleich beider Strategien auf phylogenetischer Ebene lässt sich feststellen, dass bei der vertikalen Weitergabe von Symbionten die phylogenetischen Bäume der Symbionten über einen großen evolutionären Zeitraum hinweg kongruent zu denen des Wirtes sind (Baumann 2005, Dale 2006, Moran *et al.* 2008, Moya *et al.* 2008). Bei manchen Symbiosepartnern lässt sich sogar eine Kospeziation hinsichtlich ihrer Genealogie feststellen (Hurtado *et al.* 2003, Schramm *et al.* 2003, Allen *et al.* 2007, Goffredi *et al.*), wogegen bei den meisten der horizontal aufgenommenen Symbionten und ihren Wirten keine Hinweise auf phylogenetische Kongruenz oder auf Kospeziation vorliegen.

Die ersten Hinweise, dass Mikroorganismen vertikal von einer Schwammgeneration zur nächsten weitergegeben werden fanden sich bereits 1976 bei dem Schwamm *Aplysina* spp. (Gallissian und Vacelet 1976). Dabei konnte mittels TEM gezeigt werden, dass Oozyten Mikroorganismen aus dem Mesohyl des Adult-Schwammes via Endozytose in Vesikel aufnehmen und einlagerten. Keines der dabei aufgenommenen Mikroorganismen wurde zu einem späteren Zeitpunkt verdaut, weshalb die Autoren daraus schlossen, dass diese Mikroorganismen keine trophische Funktion hatten, sondern an die nächste Schwammgeneration weitergegeben wurden (Gallissian und Vacelet 1976). In dem Schwamm *Chondrilla australiensis* wird der cyanobakterielle Symbiont *Aphanocapsa feldmannii* in die Oozyten eingelagert, hier allerdings mit Hilfe sogenannter „nurse cells“, welche die Oozyten während ihrer Reifung unter anderem mit Nährstoffen versorgen (Usher *et al.* 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wird für den karibischen Schwamm *Ectyoplasia ferox* vermutet, bei dem die Oozyten von einer 5 µm

Einleitung

starken Schicht aus „*nurse cells*“ ummantelt sind, die eingeschlossene Symbionten enthalten (Schmitt *et al.* 2007b). Der gram-negative, spiralförmige Symbiont des arktischen Schwammes *Halisarca dujardini* hingegen dringt aktiv in die heranreifende Oozyte ein und sichert somit seine Weitergabe an die nächste Schwammgeneration (Ereskovsky *et al.* 2005).

Neben der morphologischen Beweisführung spielen heutzutage auch phylogenetische Methoden auf Basis des 16S rRNA Gens eine essentielle Rolle. Die Untersuchungen der mikrobiellen Konsortien von Adult-Schwämmen und ihren reproduktiven Stadien mit Hilfe der DGGE und anschließender Analyse der Bandenmuster lieferte zusätzliche Beweise für die vertikale Weitergabe von Schwamm-Symbionten wie im Beispiel des karibischen Schwammes *Ircinia felix* (Schmitt *et al.* 2007a). Weitere phylogenetische Untersuchungen mittels 16S rRNA Genbanken und der Berechnung phylogenetischer Bäume konnten erstmals sogenannte „*vertical transmission*“ (VT) Cluster aufzeigen. Ein VT-Cluster wurde definiert als eine Clade aus zwei oder mehr 16S rRNA Gen Sequenzen, die sowohl aus Adult-Schwammgewebe sowie aus den korrespondierenden Embryonen oder Larven isoliert wurden (Schmitt *et al.* 2008). Dank dieser und weiterer Methoden (z.B. FISH, 454 pyrotag sequencing) konnte die vertikale Weitergabe von Schwammsymbionten für eine Vielzahl an Schwämmen wie zum Beispiel für *Mycale laxissima* (Enticknap *et al.* 2006), *Corticium sp.* (Sharp *et al.* 2007), *Rhopaloeides odorabile* und *Luffariella variabilis* (Steger *et al.* 2008), *Agelas conifera*, *Agelas wiedenmayeri*, *Corticium sp.*, *Ectyoplasia ferox*, *Ircinia felix*, *Smenospongia aurea*, *Xestospongia muta* (Schmitt *et al.* 2008), *Svenzea zeai* (Lee *et al.* 2009), *Ianthella basta*, *Ircinia ramosa* und *Rhopaloeides odorabile* (Webster *et al.* 2010) und *Ectyoplasia ferox* (Gloeckner *et al.* 2012b) bestätigt werden. Dies lässt für die meisten der vertikal weitergegebenen Symbionten auf eine Kospeziation mit ihrem Wirt vermuten, konnte allerdings bis jetzt nur für das Cyanobakterium *Oscillatoria spongelliae* und den vier Schwämmen *Lamellodysidea herbacea*, *Lamellodysidea chlorea*, *Lendenfeldia chondrodes* und *Phyllospongia papyracea* bewiesen werden (Ridley *et al.* 2005).

Hinweise auf horizontale Aufnahme von Schwamm-Symbionten aus dem umgebenden Meerwasser zu finden, gestaltet sich ungleich schwieriger. So konnten Webster *et al.* (2010) zeigen, dass einzelne Vertreter des Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortiums wie zum Beispiel des Candidatus Phylum Poribacteria in sehr geringer Konzentration im umgebenden Meerwasser zu finden sind. Die Autoren stützen hiermit ihre Theorie, dass Symbion-

Einleitung

ten, sobald sie einmal ins umgebene Meerwasser gelangt sind, als sogenannte „*seed organisms*“ dienen können. Diese würden wiederum vom Schwamm eingestrudelt und ins Mesohyl aufgenommen, wo sie sich weiter vermehren und letztendlich so das bakterielle Konsortium des Juvenil-Schwammes mit aufbauen könnten. Eine andere Studie an 32 Schwämmen aus 8 verschiedenen geographischen Regionen weltweit unterstützt die Annahme, dass Schwämme ihre mikrobiellen Konsortien über eine Kombination aus vertikaler Weitergabe und horizontaler Aufnahme aufrechterhalten (Schmitt *et al.* 2011a). Diese These wird davon getragen, dass in allen untersuchten Schwämmen eine geringe Anzahl an Sequenzen (0,001% aller gefundenen Sequenzen bei 97% Sequenz Ähnlichkeit) gleich waren. Diese Sequenzen werden als „*core community*“ bezeichnet, die nach Annahme der Autoren vermutlich horizontal aufgenommen werden. Dem gegenüber steht die Art-spezifische mikrobielle Gemeinschaft, deren Sequenzen nur in einer Schwamm Art gefunden wurden und deshalb wahrscheinlich vertikal weitergegeben werden (Schmitt *et al.* 2011a).

2.3 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, die vertikale Weitergabe bzw. horizontale Aufnahme von Symbionten an dem karibischen Modellschwamm *Ectyoplasia ferox* zu untersuchen. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Beschreibung des mikrobiellen Konsortiums des Adult-Schwammes, Embryonal- und Larvalstadien hinsichtlich phylogenetischer Zusammensetzung und metabolischer Aktivität. Weiterhin sollte die Hypothese der Mischung aus vertikaler Weitergabe und horizontaler Aufnahme untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Bakteriengehalt im adulten Schwammgewebe vor und nach dem Zeitpunkt des „*spawning*“ bestimmt. So sollte erstmalig experimentell nachgewiesen werden, ob ein Schwamm Symbionten an das umgebende Meerwasser verlieren kann. Mittels Erzeugung Symbionten-freier Juvenil-Schwämme durch Antibiotika-Behandlung sollte ein Symbionten-freier Wirtsschwamm erzeugt werden, um eine Basis für weiterführende Experimente zu den Mechanismen der symbiontischen Interaktion zu liefern.

Ein weiterer Gegenstand der hier vorgenommenen Untersuchungen war der phylogenetische Vergleich der mikrobiellen Konsortien verschiedener mediterraner *Oscarella*-Arten. Im Besonderen sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Farbvariationen von *Oscarella lobularis* unterschiedliche mikrobiellen Gemeinschaften in sich beherbergen und inwieweit sich Standortfaktoren auf deren mikrobielle Gemeinschaft auswirken.

Abschließend sollten diverse karibische Schwammarten hinsichtlich ihrer Bakterienhaltigkeit untersucht werden. Es wurden die Methoden der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), DAPI-Färbung und DGGE untereinander verglichen, um zukünftigen Wissenschaftlern ein nützliches Werkzeug für weitere Studien dieser Art an die Hand zu geben.

3 Material und Methoden

3.1 Materialsammlung

Das in dieser Doktorarbeit verwendete Material des karibischen Schwammes *Ectyoplasia ferox* wurde während zwei Expeditionen im September 2009 und 2010 bei Tauchgängen am Conch Riff (24°56'863''N; 80°27'230''W) im „Florida Keys National Marine Sanctuary“ vor der Küste von Key Largo in einer Tiefe von ca. 12 m gesammelt, wobei die Ausrüstung und Ausstattung des „NOAA's Undersea Research Center“ (NURC) genutzt werden durfte. Alle weiteren karibischen Schwammarten, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden während einer 14-tägigen Bahamas-Expedition im August 2010 gesammelt (genaue Angaben zu allen hier verwendeten Schwammproben siehe Tabellen in Kapitel 7.10)

Das Schwammmaterial der verschiedenen *Oscarella*-Arten wurde von Dr. Alexander Ereskovsky im westlichen Mittelmeer vor der Küste Marseilles zwischen Juni und Oktober 2011 gesammelt. Proben der Schwämme *O. balibaloï*, *O. microlobata*, *O. tuberculata* und *O. viridis* stammten aus der Unterwasserhöhle Jarrei (43°11'48.92''N; 5°21'48.62''O) in 12-13 m Tiefe, Proben des Schwammes *O. lobularis* aus der Unterwasserhöhle Endoume (43°16'47.70''N; 5°20'59.74''O) in 4 m Tiefe (Juni 2011). Die verschiedenen farblichen Variationen von *O. lobularis* wurden vor der Insel Marie (43°12'45.16''N; 5°19'45.59''O) in 5-8 m Tiefe gesammelt, während weitere rosafarbene *O. lobularis* Individuen von der Insel Riu Sud (43°10'21.93''N; 5°23'31.58''O) aus 22-25 m Tiefe und von der Insel Frioul (43°15'41.5''N; 5°17'16.58''W) aus 8 und 23 m stammten (September und Oktober 2011).

3.1.1 Adultes Schwammmaterial

Das *Ectyoplasia ferox* Material wurde am Conch Riff (24°56'863''N; 80°27'230''W) gesammelt. Hierfür wurde mit einer frischen Rasierklinge (Lutz Blades) ein ca. 5 cm mal 2 cm großes Stück Schwamm herausgeschnitten und in einem unbenutzten 1 L Ziploc-Beutel (Toppits) inklusive Meerwasser an die Oberfläche gebracht. Beim Herausschneiden der Schwammprobe wurde darauf geachtet, dass das Schwammgewebe nicht auf Grund zu großer Krafteinwirkung „ausblutete“ und somit die Schwammsymbionten und Schwammzellen aus

Material und Methoden

dem Gewebe gequetscht wurden. Nach jedem Tauchgang wurde das adulte Schwammmaterial auf Eis aufbewahrt und schnellstmöglich an Land prozessiert.

3.1.2 Reproduktives Schwammmaterial

Ectyoplasia ferox ist ein oviparer Schwamm und entlässt seine Gameten in einer gelatineähnlichen Matrix. Diese wurde mit sterilen 20 ml Spritzen (Penta, Pentaferte S.p.A., Italien) aufgenommen und wiederum in Ziploc-Beuteln (Toppits) inklusive Meerwasser aufbewahrt. Im Labor wurden die Embryos getrennt nach Elternindividuum in 1 L Messbechern mit 500 ml Meerwasser gehältert, bis 48 Stunden später die Larven schlüpften. Das Meerwasser wurde jeweils am Abend zu 70% durch frisches ersetzt.

3.1.3 Probenverarbeitung

Die gesammelten Schwammproben wurden dreimal mit sterilfiltriertem Meerwasser gewaschen, bevor sie entsprechend ihrer weiteren Verwendung fixiert wurden. Für die Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM) und Raster-Elektronen Mikroskopie (REM) wurden die Proben in 2,5% Glutaraldehyd in Calcium- und Magnesiumfreiem künstlichem Meerwasser (CMF-ASW) (Rottmann *et al.* 1987) bzw. in 2,5% Glutaraldehyd, 0,4 M Cacodylatpuffer und Meerwasser im Verhältnis 1:4:5 (*Oscarella*-Proben) fixiert (Gloeckner *et al.* 2012a). Für die DNA-Extraktion wurden die Proben entweder direkt bei -80 °C eingefroren oder in 70% E-tOH fixiert und bei -20 °C gelagert. Die Proben für die RNA-Extraktion wurden bei -80°C in RNA-later (Ambion) entsprechend den Herstellerangaben aufbewahrt. Bei adulten Gewebeproben wurde immer darauf geachtet, dass die Probe sowohl Mesohyl als auch Pinakoderm enthielt. Weiterhin wurden die alten Schnittkanten entfernt, um eventuelle Verunreinigungen durch Meerwasser oder Ähnlichem vorzubeugen.

3.1.4 Antibiotika

Für das Antibiotika-Experiment zur Generierung symbiontenfreier Juvenil-Schwämme wurden ca. 40-100 Larven des Schwammes *Ectyoplasia ferox* in Petrischalen mit ca. 50 ml Meerwasser gehalten. Das Experiment wurde mit drei Schwammindividuen durchgeführt,

Material und Methoden

wobei jeweils fünf Ansätze pro Schwammindividuum mit Antibiotikazugabe und fünf Ansätze ohne Antibiotikazugabe als Kontrolle herangezogen wurden.

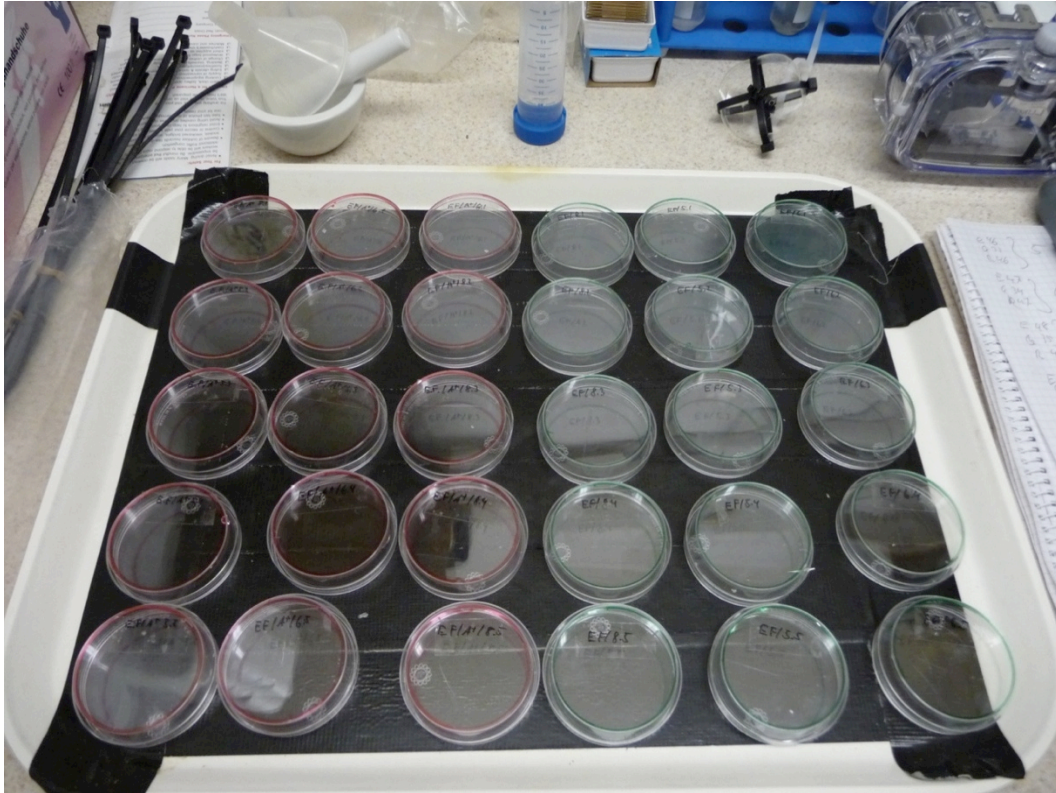


Abb. 3.1: Versuchsaufbau des Antibiotika Experimentes. Die rot markierten Petrischalen links im Bild enthalten *E. ferox* Larven mit Antibiotikazugabe, die grün markierten rechts im Bild die jeweiligen Kontrollgruppen. Die Petrischalen wurden wie folgt beschriftet: EF=*E. ferox*, A⁺=Larven mit Antibiotikazugabe, A⁻=Larven ohne Antibiotikazugabe. Die erste Zahl bezeichnet das Individuum, die zweite die Nummer des jeweiligen Ansatzes. Für das Experiment wurden drei Individuen EF5, EF6 und EF8 herangezogen, wobei jeweils 5 Ansätze pro Individuum mit und ohne Antibiotika ausgewertet wurden. Foto: Volker Glöckner.

Als Antibiotika wurden Ampicillin (Roth) und Gentamycin (Sigma) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwendet (Friedrich *et al.* 2001). Jeweils am Abend wurden ca. 70% des Meerwassers durch sterilfiltriertes Meerwasser ersetzt. Für das Sterilfiltrieren des Meerwassers wurden Millipore® Sterifil® Filterunits mit 500 ml Fassungsvermögen und 0,22 µm Porengröße verwendet. Nach vier Tagen Antibiotikabehandlung wurden einige Larven für die spätere DNA- und RNA-Extraktion sichergestellt. Die verbliebenen Larven wurden nach ihrer Festsetzung am Boden der Petrischale in das Diadema Riff (25°01'610''N; 80°23'671''W) gebracht und dort an Betonblock befestigt, um zu untersuchen, ob sich aus den festgesetzten Larven gesunde Adult-Schwämme entwickeln.

Material und Methoden

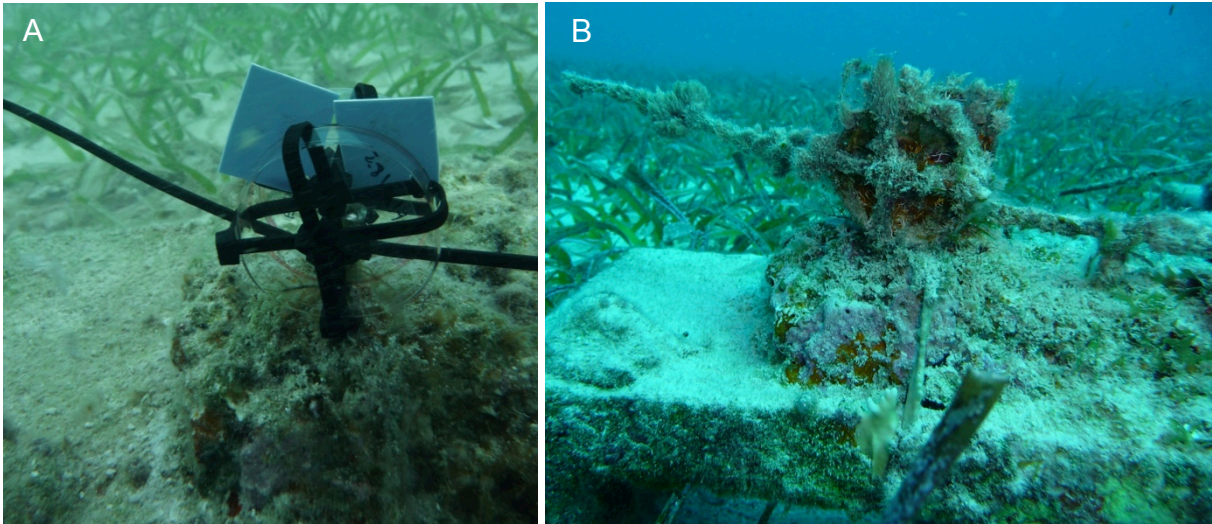


Abb. 3.2: Unterwasserfotografie einer Petrischale mit festgesetzten *E. ferox* Larven, die an einem Betonblock im Diadema Riff auf ca. 6 m Tiefe befestigt wurde (A). Dieselbe Petrischale ein Jahr später (B). Fotos: Volker Glöckner.

3.2 Molekulare Methoden

3.2.1 Lichtmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Observer Z1 (Zeiss, Deutschland) unter Nutzung der AxioVision Software erstellt. Die Bakterienauszählungen fanden unter Verwendung des UV Lichtes und des Zeiss Filters Nummer 49 statt.

3.2.2 Transmissions-Elektronen Mikroskopie

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden die Schwammproben in einer 2,5% Mischung Glutaraldehyd CMF-ASW fixiert (Rottmann *et al.* 1987). Dabei durften die adulten Schwammgewebestücke eine Seitenlänge von 1 mm nicht überschreiten. Die so fixierten Proben wurden fünfmal für je 3 min mit Cacodylatpuffer pH 7,2 gewaschen und wiederum mit 2% gepuffertem Osmium (OsO_4) für 90-120 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit H_2O (5x für 3 min) wurden die Proben mit 0,5% Uranylacetat über Nacht kontrastiert. Nach dem Auswaschen (H_2O 5x für 3 min) des Uranylacetats konnte mit der schrittweisen Entwässerung der Proben begonnen werden. Hierfür wurden diese jeweils 30 min bei 4 °C mit 50, 70, 90, 96 und 100% EtOH versetzt, wobei der letzte Schritt nochmals bei 4 °C und bei Raumtemperatur wiederholt wurde. Vor dem ersten Einbettungsschritt wurden die Proben weiter mit Propylenoxid (3x für 30 min) entwässert und über Nacht in einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und EPON812 belassen. Abschließend folgten zwei Einbettungen für je zwei Stunden in EPON und einer Stunde in der EPON Einbettungsform, die dann über Nacht bei 60 °C auspolymerisierte. Die Proben wurden anschließend mit einem MT-7000 Ultramikrotom (RMC, Tuscon, AZ, USA) geschnitten und an einem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM 10; Zeiss, Germany) ausgewertet. Semi-Dünnschnitte für die Lichtmikroskopie wurden mit Azur 2 und Methylenblau (Merck, Deutschland) gefärbt.

3.2.3 Raster-Elektronen Mikroskopie

Die für die Raster-Elektronen Mikroskopie (REM) fixierten Proben wurden 5x für je 5 min mit Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und stufenweise (30, 50, 75, 90, 100%) mit Aceton entwässert. Nach der Kritischen-Punkt-Trocknung mit CO_2 wurden die Präparate mit einer

Material und Methoden

Mischung aus Gold und Palladium beschichtet. Die Auswertung fand mit einem Zeiss DSM 962 Rasterelektronenmikroskop (Oberkochen, Deutschland) statt.

3.2.4 Quantifizierung von Bakterien in adultem Schwammgewebe

Hierfür wurde ein Stück Schwammgewebe mit einem sterilen Skalpell aus dem Schwamm herausgeschnitten und dreimal mit 0,2 µm steril filtriertem Meerwasser gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Schwammstück sowohl Pinacoderm als auch Mesohyl enthielt. Von dem Schwammgewebe wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 durch Zugabe von 9 ml CMF-ASW zu einem Stück Schwammgewebe, äquivalent zu 1 ml, hergestellt (Fieseler *et al.* 2004). Diese wurde anschließend mit Hilfe von Mörser und Pistill homogenisiert und durch ein 100 µm NITEX- Tuch gefiltert. Das so entstandene Filtrat wurde anschließend mit 3,7% Formaldehyd in Endkonzentration fixiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die im NITEX- Tuch verbliebenen Gewebereste wurden mit 4,5 ml CMF-ASW abgewaschen und ein weiteres Mal homogenisiert, durch das NITEX-Tuch gefiltert und mit 3,7% Formaldehyd in Endkonzentration fixiert. Auch hier erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

Es wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-3} von jedem Extrakt hergestellt und mit 0,7 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) in Endkonzentration für 30 min im Dunkeln gefärbt. Die DAPI-Stocklösung (100 µg/ml) wurde einmal hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert. 1 ml des so gefärbten Extraktes wurde mit 9 ml CMF-ASW verdünnt und mit Hilfe einer Vakuum-Filtrationseinheit von Sigma-Aldrich® auf einen schwarzen Filter mit 25 mm Durchmesser und 0,2 µm Porengröße aus Polycarbonat-Membran (Millipore) aufgezogen, der seinerseits wiederum durch eine 0.45 µm Cellulose-Nitrat-Filter unterstützt wurde (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland). Mittels Handpumpe wurde ein Unterdruck von ca. 10 mmHg erzeugt. Der Filter wurde anschließend noch einmal mit 9 ml CMF-ASW und 5 ml 70% EtOH gewaschen. Abschließend wurde der schwarze Polycarbonat-Membranfilter auf ein Deckglas gelegt und mit Citiflour (Citifluor Ltd., London) zum besseren Erhalt der Fluoreszenz überschichtet und eingedeckelt.

Die Anzahl der Bakterien wurde an einem Axiolab Mikroskop (Zeiss, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv unter UV-Licht mit Hilfe des Zeiss-Filters Nummer 49 bestimmt. Dabei wurden je sieben Individuen für den „*spawning*“-

Material und Methoden

Zeitpunkt sowie post- und nicht-„*spawning*“-Zeitpunkt verwendet. Pro Individuum wurden drei mal zehn Kleinfelder (Kantenlänge 123 μm und 125 μm) für beide Schwammextrakte ausgezählt. Die Anzahl an Bakterien pro Gramm Schwammmaterial wurde unter Berücksichtigung der Größe der Filterfläche sowie sämtlicher Verdünnungsstufen berechnet. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 18.0 durchgeführt.

3.2.5 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA und der anschließenden Analyse in der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) wurde das „Fast DNA Spin Kit (for soil)“ der Firma MP Biomedicals (Heidelberg, Deutschland) nach Angabe des Herstellers verwendet. Zur Erstellung der Genbank aus adultem Schwammmaterial wurden tiefgefrorene Schwammstücke (-80 °C) von ca. 10-15 mm³ Größe in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Schwammstück sowohl Pinakoderm als auch Mesohyl enthielt. Das Adult-Schwammmaterial bzw. Embryonal-Schwammmaterial (in 70% EtOH fixiert) wurde mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und direkt in die dem Kit beiliegenden „Lysing Matrix Tubes“ gegeben. DNA aus larvalem Material wurde gewonnen, indem die Larven in 150 μl ddH₂O bei 100 °C für 10 min erhitzt wurden. Diese Lösung wurde dann direkt als Matrize („template“) in der PCR verwendet (Schmitt *et al.* 2008). Zusätzlich wurde die DNA mittels PCR überprüft, in der wahlweise die universellen eubakteriellen Primer 27f und 1492r (Lane 1991) für die 16S rRNA Genbank oder die Primer 341f+GC und 907r (Muyzer *et al.* 1998) für die DGGE verwendet wurden.

3.2.6 DNA- und RNA-Extraktion

Um die metabolische Aktivität der Symbionten in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen, wurden von jedem Stadium (adult, embryonal, larval) Gewebeproben genommen und anschließend mit dem „AllPrep DNA/RNA-Mini-Kit“ (Qiagen) sowohl die genomische DNA als auch die Gesamt-RNA nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Um die DNA von evtl. vorhandener RNA zu reinigen, wurden 1,5 μl RNase (10 mg/ml) pro 100 μl zugegeben und bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die extrahierte RNA wurde zuerst mit 20u/ μl „SUPERase-In“ (Invitrogen) behandelt, um evtl. vorhandene RNAsen zu inhibieren. Anschließend fand

Material und Methoden

ein DNA-Verdau statt, indem man 6 µl DNase und 5 µl DNase-Puffer hinzugab und für eine Stunde bei 37 °C inkubierte. Abschließend wurde der Verdau mit 6 µl Stopp-Puffer beendet und die so gereinigte RNA 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf -80 °C gelagert wurde.

3.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerasen Ketten Reaktion (PCR) wurden gezielt DNA-Fragmente des 16S rRNA Gens amplifiziert. Als „template“ dienten die aus dem Schwammmaterial extrahierte DNA (16S-PCR) oder intakte Bakterienzellen (Kolonie-PCR). Ein 50 µl Standard-PCR-Reaktionsansatz setzte sich aus 10x Dream Taq Green Buffer (Fermentas), 2 mM von beiden Primern (z.B. 27f und 1492r für 16S rRNA Gene), 0,2 mM dNTPs (Sigma), sowie 1,25 U Dream Taq Polymerase (Fermentas) zusammen. Bei Bedarf wurde das PCR-Additiv 5x Q-Solution (Qiagen) bzw. 1µl Bovine Serum Albumin (BSA) zur Verbesserung der PCR-Reaktion zugesetzt. Sämtliche im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind tabellarisch unter Angabe der Sequenzen im Anhang (Kapitel 7.8) aufgelistet. Das Standard-PCR-Protokoll umfasste einen initialen Denaturierungsschritt bei 96 °C für 2-5 min, gefolgt von 30-40 Zyklen bestehend aus einer weiteren Denaturierung bei 96 °C für 30 sec bis 1 min, dem Primer-Annealing bei 45-56 °C für 30 sec und einer Elongation bei 72 °C für 25-90 sec. Abschließend erfolgte eine Endelongation bei 72 °C für 5 min. Die PCR-Produkte wurden generell mittels des „NucleoSpin ExtractII Kits“ (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Dasselbe Kit diente auch zur Extraktion von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen.

Die Annealing-Temperatur der PCR-Protokolle richtete sich generell nach den Angaben des Herstellers (Sigma). Alternativ wurde sie über die Formel $T_m = 4 * (G + C) + 2 * (A + T)$ ausgehend von der Nukleotidsequenz der jeweils verwendeten Primer berechnet. Die Länge des Elongationsschritts wurde individuell an die Länge des zu erwartenden Fragmentes angepasst. Der Berechnung lag dabei eine durchschnittliche DNA-Syntheserate von ca. 1 kb/min für die Dream Taq DNA Polymerase zugrunde.

3.2.8 Herstellung hitzekompetenter Zellen

Für die Herstellung von hitzekompetenten Zellen wurden Zellen des *E. coli* Stammes NovaBlue der $MnCl_2$ -Methode unterzogen. Dafür wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml einer NovaBlue-Übernachtskultur inokuliert und bei 19 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5 angezogen. Einer 10 minütigen Inkubation auf Eis folgte die Pelletierung der Zellen für 10 min bei 4 °C und 4.000 rpm. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Pelletierung (10 min, 4 °C, 4.000 rpm) wurden die Zellen vorsichtig in 20 ml eiskaltem TB-Puffer und 1,4 ml DMSO gelöst. Der Lagerung von 100 µl Aliquots bei -80 °C ging letztlich ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff voraus.

3.2.9 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Ligation amplifizierter DNA-Fragmente wurde das pGEM-T-easy Vektor System (Promega) verwendet. Da die Dream Taq DNA-Polymerase einen nicht codierten Adenin-Rest am 3'-Terminus während der Amplifizierung anhängt, konnten die DNA-Fragmente direkt in dem im Kit enthaltenen linearisierten Vektor mit Thymin-Überhang ligiert werden. Ein 10 µl Ligations-Ansatz setzte sich aus 5 µl 2x Rapid Ligation Mix, 1 µl pGEM[®]-T Easy Vector (50ng), 1µl T4 Ligase und 2-3 µl aufgereinigtem PCR-Produkt zusammen. Die Ligation fand über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C statt.

Die mit den DNA-Fragmenten ligierten Vektoren wurden anschließend in hitzekompetente *E. coli*-Zellen des Stammes NovaBlue transformiert. Dazu wurde ein Aliquot (100 µl) hitzekompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und je 50 µl Zellen mit 1-2 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 75-90 Sekunden bei 42 °C im Heizblock. Hierauf folgte eine weitere Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis, wonach 1 ml frisches LB-Medium zu den Ansätzen gegeben und dieser bei 37 °C für 2 Stunden im Schüttler inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen mithilfe von Glas-kugeln auf AIX Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um anschließend eine „Blau-Weiß-Selektion“ der Plasmid-tragenden Klone mit Insert durchzuführen. Weiße Klone wurden direkt als „template“ in eine Kolonie-PCR mit den Vektorpri-

Material und Methoden

mern SP6 und T7 eingesetzt, um zu überprüfen, ob das „insert“ des gewählten Klons die richtige Größe besaß.

Die im Anschluss an die Kolonie-PCR durchgeführte Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse diente einerseits der Bestimmung der Diversität, der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente sowie andererseits der Minimierung der Anzahl an durchzuführenden Plasmid-Mini-Präparationen und Sequenzierungen. Zu diesem Zweck wurde ein Doppel-Verdau mit den Restriktionsenzymen *MspI* und *HaeIII* (Fermentas) durchgeführt. Ein 20µl Reaktionsansatz beinhaltete 10µl des Kolonie-PCR-Produkts, 10U eines jeden Enzyms sowie 10x NEB Puffer. Der Verdau wurde bei 37 °C für 15-30 Minuten durchgeführt und anschließend zur Analyse auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen. Gleiche Bandenmuster wurden zu einem Phylotyp zusammengefasst. Ein Phylotyp ist in der Mikrobiologie definiert als eine Gruppe von Sequenzen mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zueinander z. B. von 99,0%. Da die hier verwendeten Restriktionsenzyme nur an ganz bestimmten Stellen das 16S rRNA Gen schneiden kann man davon ausgehen, das gleichen Bandenmustern dasselbe oder zumindest ein sehr nahe verwandtes 16S rRNA Gen zugrunde liegt. Von den auf Grund der RFLP-Analyse weiter verwendeten Klonen wurden Kryokulturen mit Glycerin (15% Endkonzentration) angefertigt, die bei -80 °C gelagert wurden.

3.2.10 Plasmid-Mini-Präparation

Von den weißen Klonen mit der richtigen Insertgröße wurden zunächst Übernachtskulturen in 3 ml LB_{amp} bei 37 °C angezogen. 2 ml der Übernachtskultur wurde bei 13.000 rpm für 2 Minuten pelletiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl Plasmid-Mini-Präp Puffer I resuspendiert, wonach 150 µl Plasmid-Mini-Präp Puffer II zugegeben wurden. Nach vorsichtigem Durchmischen der Proben durch Invertieren wurden 150 µl Plasmid-Mini-Präp Puffer III hinzugefügt und anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das so entstandene Präzipitat wurde für 20-30 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in einem zweiten Zentrifugationsschritt für 15-25 min bei 13.000 rpm pelletiert. Der nun klare Überstand wurde wiederum in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 350 µl (= 0,7% v/v), -20 °C kaltem Isopropanol gefällt, wonach sich ein dritter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13.000 rpm anschloss. Die so pelletierte Plasmid-DNA wurde durch

Material und Methoden

Zugabe von -20 °C kaltem 70% EtOH gereinigt und bei Raumtemperatur getrocknet (Sambrook *et al.* 1989). Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 50µl H₂O dest. aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.11 Sequenzierung

Ein 10 µl Standard-Sequenzier-PCR-Ansatz enthielt 2 µl Premix, 2 µl 5x Sequenzierpuffer (ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), 1-2 µl Plasmid-DNA sowie 1 µl eines 25 pmol Primers (T7, SP6 oder 341f). Das Sequenzier-PCR-Protokoll begann mit einer initialen Denaturierung bei 96 °C für 2 min gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus einer weiteren Denaturierung bei 96 °C für 30 sec, dem Primer Annealing bei 45 °C für 30 sec und der Elongation bei 60 °C für 4 min. Die Analyse der Sequenzen erfolgte an einem Perkin Elmer ABI 377 XL Sequenzierer im Institut für Immunologie und Virologie der Universität Würzburg bzw. durch LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland).

3.2.12 Sequenziauswertung

Die Sequenz-Rohdaten wurden mit dem Programm GENTle (Magnus Manske, Universität Köln) analysiert, gegebenenfalls korrigiert (z.B. fehlerhafte Interpretationen der Fluoreszenz, Dye Blobs etc.) und die Vektorsequenzen entfernt. Mit Hilfe des ContigExpress Tools des Programmes Vektor NTI™ 11 advanced (Invitrogen) bzw. mit Geneious Pro v5.6 (Biomatters, Ltd., Auckland, Neuseeland) wurden aus den einzelnen Vektorsequenzen überlappende Sequenzbereiche (contigs) generiert. Die so entstandenen Voll- bzw. Teilsequenzen wurden mit der Datenbank (GenBank) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) unter Verwendung des „Basic Local Alignment Search Tools“ (BLASTn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul *et al.* 1990)) abgeglichen. Für die 16S rRNA-Gen Sequenzen diente dabei BLASTn. Unter Verwendung des Programmes mothur (Schloss *et al.* 2009) wurden die Sequenzen in sogenannte „operational taxonomic units“ (OTUs) eingeteilt. In einem OTU wurden alle Sequenzen zusammengefasst, die eine Sequenzähnlichkeit von 99% und höher zueinander aufwiesen (Stackebrandt und Ebers 2006). Nur eine zufällig gewählte Sequenz pro OTU wurde weiter für die phylogenetische Analyse verwendet. Um eine hohe Qualität der generierten Sequenzen garantieren zu können, wurden alle Sequenzen

mehrfach mit Hilfe des Programmes Pintail 1.0 (Ashelford *et al.* 2005) auf Chimären überprüft.

3.2.13 Phylogenetische Sequenzanalyse

Die in dieser Arbeit erstellten DNA-Sequenzen wurden zusammen mit den ihnen am nächsten verwandten Sequenzen, (ermittelt durch BLASTn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul *et al.* 1990)), mit Hilfe des SINA-Webaligners (Pruesse *et al.* 2012), anhand eines SILVA-Referenz-Alignments automatisch aligniert. Dieses Alignment wurde anschließend mit einer modifizierten Form der SILVA 100- bzw. SILVA 106-Datenbank (Pruesse *et al.* 2007) zusammengeführt, bevor manuelle Korrekturen vorgenommen wurden. Unter Verwendung des Phylogenie-Programmes ARB (Ludwig *et al.* 2004) wurden phylogenetische Distanz- (Neighbor-Joining mit Juke-Cantor Korrektur), Maximum-Parsimony- und Maximum Likelihood-Bäume errechnet, wobei nur Sequenzen mit einer Mindestlänge von 1200 bp verwendet wurden. Kürzere Sequenzen wurden unter Zuhilfenahme des Werkzeuges Parsimony-Interaktiv (in ARB) nachträglich in den Baum eingefügt, wobei die Topologie des Baumes nicht verändert wurde. Um Aussagen über die Stabilität der einzelnen Verzweigungen des phylogenetischen Baumes treffen zu können, wurden Maximum Parsimony-Bootstrap-Werte mit einer Wiederholungsrate von 100 berechnet. Alle 16S rRNA Gensequenzen wurden bei EMBL/GenBank/DDBJ hinterlegt, wo sie unter den Zugangsnummern JN126054 bis JN126249 und JN986612 bis JN986639 für *Ectyoplasia ferox* und JX110394 bis JX110443 und JX119196 für die verschiedenen *Oscarella*-Arten zu finden sind. Alle in dieser Arbeit gezeigten phylogenetischen Bäume wurden von Dr. Susanne Schmitt (LMU München) in Zusammenarbeit mit Volker Glöckner berechnet.

3.2.14 Elektrophoretische Methoden

Für Standardanalysen von PCR-Produkten wurden 1%ige Agarosegele in 1x TAE verwendet. Für die Auswertung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs) fanden auf Grund der deutlich kürzeren Fragmente und der gewünschten höheren Auflösung 3%ige Agarosegele Verwendung. Als DNA-Größenstandards (Marker) wurde der 1kb und 100bp (verwendeten sind in Kapitel 7.7 aufgelistet). Alle zu untersuchenden Fragmente wurden elektro-

Material und Methoden

phoretisch in 1 x TAE bei 300V aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (EtBr; 10 mg / ml) angefärbt. Alternativ wurde GelGreen™ (Biotium) als Färbemittel verwendet, wobei dieses beim Gießen der Gele zugegeben wurde (1:500). Anschließend wurden die Gele unter einem UV-Transilluminator (GelDoc EQ Station kombiniert mit der Quantity One 1-D analysis Software, Biorad, München, Deutschland) fotografiert.

3.2.15 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Die denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) diente als „*fingerprinting*“-Technik dem Vergleich der mikrobiellen Konsortien aus den unterschiedlichen Entwicklungsstadien (adult, embryonal und larval). Ein 50 µl DGGE-PCR-Reaktionsansatz enthielt 10 µl Q-solution (Qiagen), 10x Dream Taq Green Buffer (Fermentas), 2 mM je Primer (341f + GCclamp und 907r, Muyzer *et al.* (1998)), 0,2 mM dNTPs (Sigma) sowie 2,5 U Dream Taq Polymerase (Fermentas). Das PCR-Programm hierfür startete mit einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 2 min gefolgt von 30-40 Zyklen, bestehend aus einer Denaturierung bei 94 °C für 1 min, dem Primer-Annealing bei 54 °C für 30 sec und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 40 sec. Abschließend folgte ein Elongationsschritt von 72°C für 5 min.

Die Stocklösungen (0 und 100%), aus denen die verwendeten 10%igen Acrylamid-DGGE-Gele gegossen wurden, enthielten 25 ml 40%iges Acrylamid/Bis, 2 ml 50x TAE, 40 ml Formamid und 42 g Harnstoff bei einem Endvolumen von 100 ml. Bei der 0%-Lösung wurde das Formamid und der Harnstoff weggelassen. Ein Standard DGGE-Gel mit einem Gradienten von 0-100% enthielt 12,5 ml 0% und 12,5 ml 100%-Lösung. Zu beiden Lösungen wurde noch 40 µl einer Ammonium-Persulfat-Lösung (APS) als Polymerisationsinitiator und 16 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator gegeben. Das Gel wurde sofort im Anschluss mit Hilfe eines Gradientengießers (Biorad) gegossen. Sobald das DGGE-Gel auspolymerisiert war, wurde es umgehend verwendet oder bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert. Die hier verwendeten 80%igen DGGE-Gele wurden mit 45 µl des PCR-Produktes mit Hilfe einer Hamilton-Spritze beladen und entweder bei 150V für 6 h oder bei 70 V für 16 h aufgetrennt. Hierbei hatte der Laufpuffer (1x TAE) eine Temperatur von 60 °C. Die verwendete Gelkammer war ein DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad). Das Gel wurde anschließend in einem Färbekammer mit 3x GelGreen™ (Biotium) und 0,1 M NaCl Lösung für 30 min gefärbt und unter einem UV-Transilluminator (GelDoc EQ Station kombiniert mit der

Material und Methoden

Quantity One 1-D analysis Software, Biorad, München, Deutschland) fotografiert. Dieselbe Software wurde verwendet um Clusteranalysen der DGGE-Bandenmuster zu erstellen, wobei die „*unweighted pair group method with arithmetic mean*“ (UPGMA) verwendet wurde. Die Clusteranalyse diente dazu die Ähnlichkeit der mikrobiellen Gemeinschaft der verschiedenen Schwamm-Proben anhand ihrer Bandenmuster zu ermitteln. Ausgewählte DGGE-Banden wurden mit einem EtOH-sterilisierten Skalpell an einem UV-Transilluminator mit einer niedrigen UV-Intensität (UVP, Model-M20, Upland, CA, USA) ausgeschnitten, in 25ml ddH₂O aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. 4 µl der so extrahierten DNA wurden als „template“ in die oben beschriebene DGGE-PCR eingesetzt, wobei die Annealingtemperatur auf 60 °C erhöht wurde, um die Bindungsspezifität der Primer zu erhöhen. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend wie unter 3.2.9 kloniert.

4 Ergebnisse

4.1 *Ectyoplasia ferox* als Modellschwamm zur Untersuchung der vertikalen Weitergabe von Schwammsymbionten

4.1.1 Reproduktion in *Ectyoplasia ferox*

Die Abgabe von Embryonen in das umgebende Meerwasser fand bei dem oviparen Schwamm *E. ferox* jährlich im August bzw. September ungefähr 6 Tage nach einem Vollmond statt (persönliche Kommunikation Niels Lindquist). Hierbei entließen alle reproduktiv aktiven Individuen ihre Embryonen zum selben Zeitpunkt in das Meerwasser. Die von einer gelatineähnlichen Matrix umgebenden Embryonen (Abb. 4.1 A-C) verblieben dabei zunächst an der Oberfläche des Adult-Schwammes angeheftet, bis die Meeresströmung sie weiter verbreitete. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Embryonen als runde, orangefarbene Kugeln mit einem Durchmesser von 200 µm sichtbar einzeln in die Matrix eingebettet waren (Abb. 4.1 B und C). 48 Stunden nach dem Zeitpunkt des „*spawning*“ begannen hunderte von Larven unter Laborbedingungen (Abb. 4.1 D) zu schlüpfen, welche zunächst einige Zeit frei in der Wassersäule schwammen, bevor sie sich an das angebotene Substrat (Plastikpetrischalen) anhefteten und sich weiter zu Juvenil-Schwämmen entwickelten (Abb. 4.1 E). Diese wurden anschließend wieder zurück ins Riff gebracht, um zu beobachten, inwieweit sich diese Juvenil-Schwämme zu gesunden Adult-Schwämmen entwickelten (Abb. 3.2.). Die Verfügbarkeit aller Entwicklungsstadien von *E. ferox* macht diesen Schwamm zu einem idealen Modellsystem hinsichtlich weiterer Untersuchungen der vertikalen und horizontalen Weitergabe von Schwammsymbionten sowie Untersuchungen zur Stabilität der mikrobiellen Gemeinschaft in Schwämmen über mehrere Schwammgenerationen hinweg.

Ergebnisse

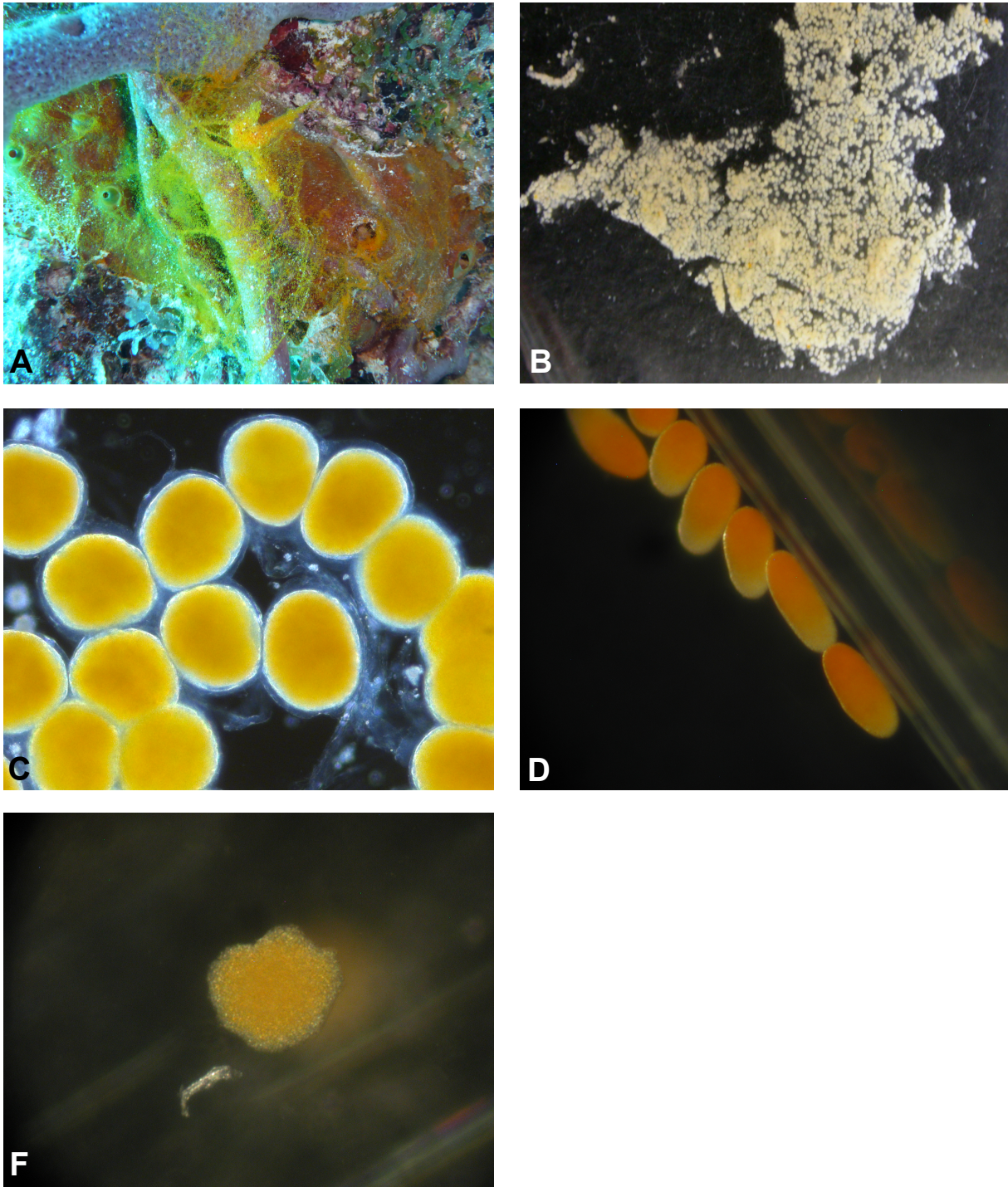


Abb. 4.1: Unterwasserfotografie von *E. ferox* umgeben von „spawning“-Material (A), Binokular Aufnahme von „spawning“-Material 5x vergrößert (B), Lichtmikroskopische Aufnahme einzelner Embryonen 7,5x (C), Binokularaufnahmen von Larven (D) und einem Juvenil-Schwamm (F) beide 7x. Abb. A wurde in natürlicher Umgebung aufgenommen, B-F unter Laborbedingungen. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

4.1.2 Mikroskopische Untersuchungen von Adult-, Embryonal- und Larval-Material

Lichtmikroskopische Untersuchungen von adultem *E. ferox* Material zeigten, dass im Mesohyl eine hohe Dichte an Mikroorganismen vorlag, die extrazellulär in der Mesohyl-Matrix lokalisiert waren (Abb. 4.2 A). Ferner fanden sich Choanozytenkammern (15-20 μm im Durchmesser) mit begeißelten Choanazyten, sowie amöboide Zellen inklusive Zellkern und elektronendichten Vesikeln (Abb. 4.2 A). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten weiterhin, dass die Embryonen im „*spawning*“-Material perlenschnurartig angeordnet waren (Abb. 4.2 B). Auch in den Embryonen wurden Bereiche mit einer hohen Dichte an Mikroorganismen gefunden, wobei sich diese Bereiche vor allem auf das Innere des Embryos konzentrierten, während sich im äußeren Bereich hauptsächlich klare Vesikel mit einer geringen Elektrodichte, die wahrscheinlich Lipidtropfen darstellen, fanden. Wie man in Abb. 4.2 C und D gut sehen konnte, war der Embryo von einer extrazellulären Matrix umgeben (vgl. auch Abb. 4.1 C). Im Gegensatz zum Embryo fanden sich in den Larven deutlich weniger Mikroorganismen, welche sich lose zwischen den Schwammzellen liegend auf den inneren Bereich der Larve konzentrierten. Neben den Mikroorganismen fanden sich hier auch größere, runde Algenzellen (Abb. 4.2 E und F). Die äußere Region weist darüber hinaus den typischen Aufbau einer Schwammparenchymella-Larve auf.

Ergebnisse

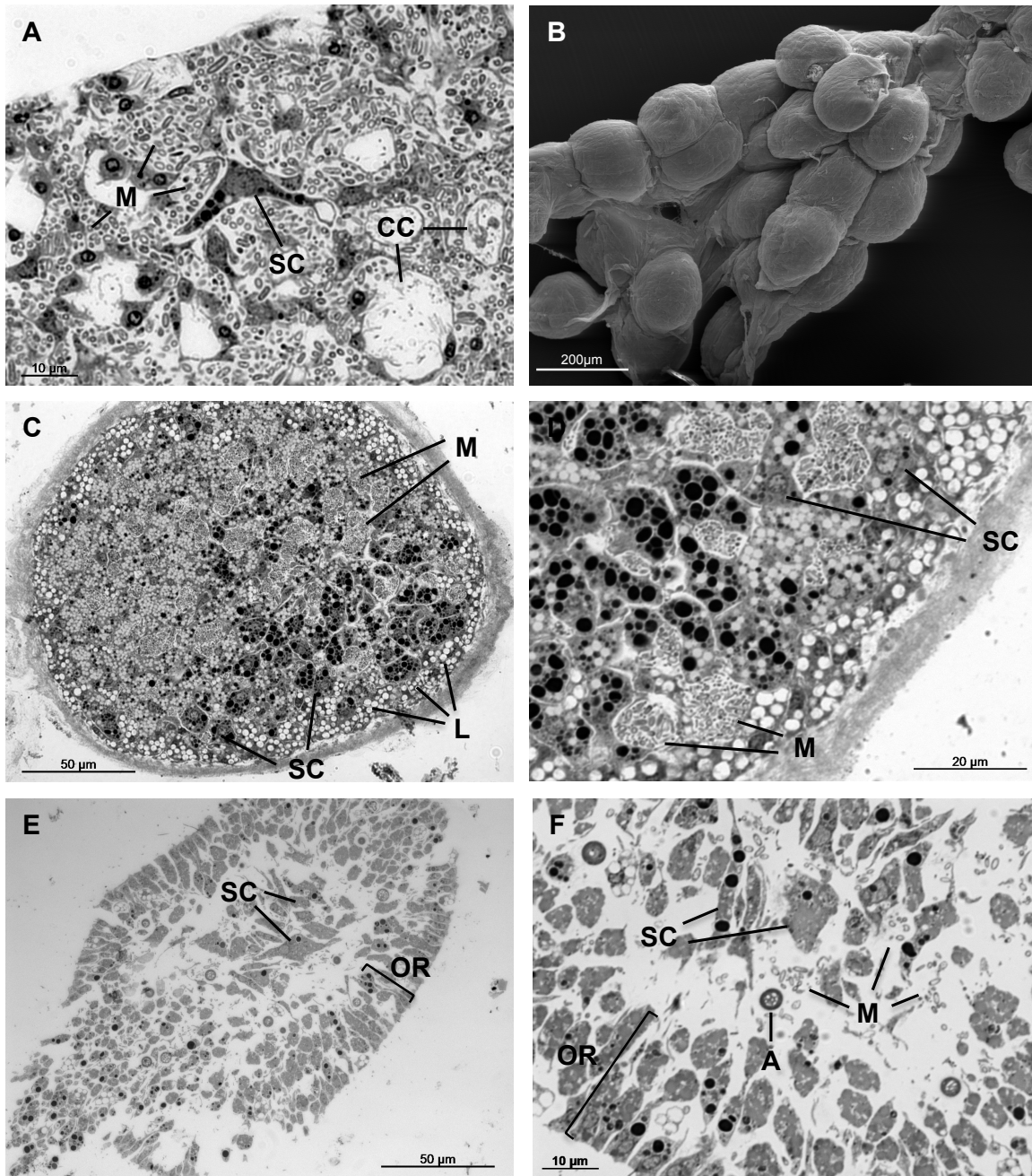


Abb. 4.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *E. ferox* adultem Material (A), Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von „spawning“-Material (B), lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme (C) und Detailaufnahme (D) eines einzelnen Embryos, sowie lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme (E) und Detailaufnahme (F) einer einzelnen Larve. Alge (A), Choanozytenkammer (CC), Lipidtropfen (L), Mikroorganismen (M), äußere Region (OR), Schwammzelle (SC). Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

Ergebnisse

4.1.3 Untersuchungen zur mikrobiellen Abundanz in reproduktiven Stadien

Die mit Hilfe von DAPI-Zählungen ermittelte Anzahl an Bakterien in adultem Schwammmaterial, ($5,8 \times 10^9$ Bakterien pro Gramm Schwamm Material) wiesen *E. ferox* als einen typischen HMA-Schwamm aus. Ein Verlust von fast 50% der Bakterien konnte dabei vom Zeitpunkt des „*spawning*“ ($5,8 \times 10^9$ Bakterien pro Gramm Schwamm Material) bis 12 Tagen später ($3,0 \times 10^9$ Bakterien pro Gramm Schwamm Material) beobachtet werden (Abb. 4.3). Statistische Analysen, mittels Wilcoxon-Test, zeigten außerdem, dass dieser Unterschied mit einem $p \leq 0,018$ ($n=7$ Individuen) statistisch signifikant war. Bemerkenswerterweise ergaben Untersuchungen ein Jahr später an nicht reproduktiv aktiven *E. ferox* Individuen ($n=7$ Individuen), dass sich die bakterielle Abundanz mit $3,44 \times 10^9$ Bakterien pro Gramm Schwammmaterial auf dem Niveau des ein Jahr zuvor ermittelten Wertes für den 12 Tage post-„*spawning*“-Zeitpunkt bewegte.

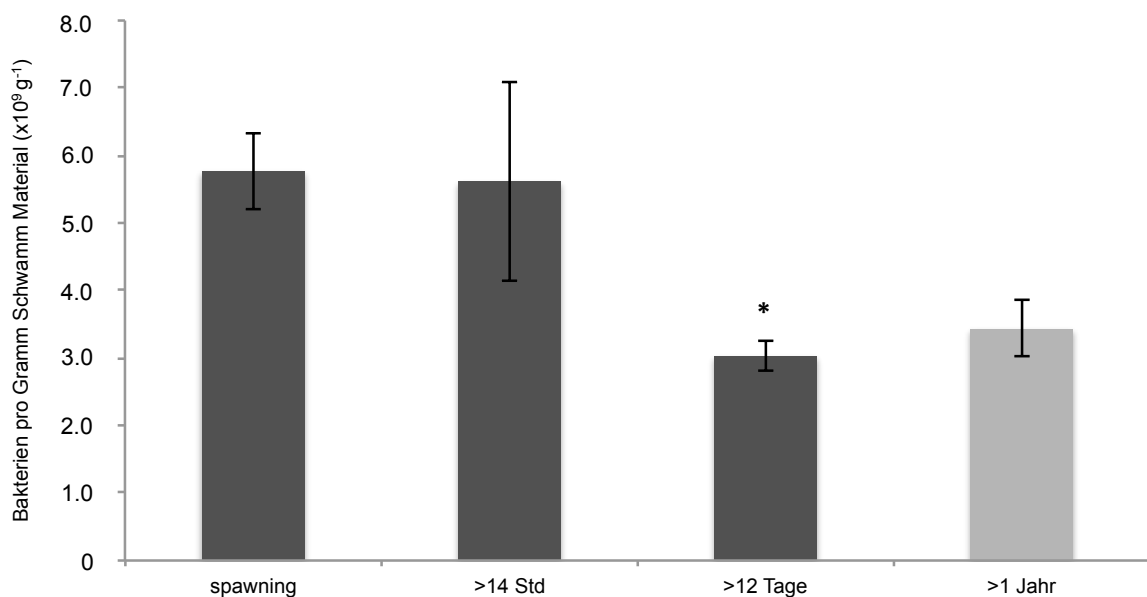


Abb. 4.3: Quantifizierung der Bakterienanzahl in *E. ferox* adult Material, am Tag des „*spawning*“, nach 14 Stunden, 12 Tagen und einem Jahr später ($n=7$ Individuen pro Zeitpunkt). Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

4.1.4 Beschreibung der mikrobiellen Diversität und Analysen zur phylogenetischen Gemeinschaft

Um die mikrobielle Diversität in *E. ferox* und seiner reproduktiven Stadien zu beschreiben, wurde für jedes Stadium eine 16S rRNA Genbank erstellt. Die 83 Vollsequenzen (adult n=50, embryonal n=18, larval n=15) konnten den folgenden bakteriellen Phyla zugeordnet werden: Alpha- (n=5), Gamma- (n=22), Delta-Proteobacteria (n=7), Chloroflexi (n=19), Acidobacteria (n=9), Spirochaetes (n=5), Nitrospira (n=4), Gemmatimonadetes, Cyanobacteria (n=2 jeweils) sowie der „*sponge-associated unclassified lineage*“ SAUL (n=8) (Abb 4.4 a-e). Mitglieder der SAUL-Gruppe wurden schon in einer vorrangegangenen Arbeit in Schwämmen beschrieben (Schmitt *et al.* 2011a), allerdings ist ihre taxonomische Einteilung bis jetzt ungeklärt. Die Suche nach Poribakterien in *E. ferox* mit spezifischen Primern (Kapitel 7.8) blieb erfolglos. Des Weiteren konnten 146 Teilsequenzen aus adultem, embryonalem und larvalem Material mit Hilfe der DGGE erstellt werden (Abb 4.5), welche den folgenden Phyla zugeordnet werden konnten: Alpha- (n=7), Gamma- (n=35), Delta-Proteobacteria (n=4), Chloroflexi (n=34), Acidobacteria (n=28), Spirochaetes (n=11), Nitrospira (n=7), Gemmatimonadetes (n=3), Bacteroidetes (n=2), Cyanobacteria (n=5) sowie der „*sponge-associated unclassified lineage*“ SAUL (n=10). Bei den anschließenden phylogenetischen Analysen aller Sequenzen ergaben sich insgesamt 21 „*vertical transmission*“ (VT)-Cluster, sowie 22 „*sponge-specific*“ Cluster (SSC) bzw. „*sponge-coral*“ Cluster (SCC) nach der Definition von Hentschel *et al.* (2002) und Taylor *et al.* (2007). Die Mehrheit dieser VT-Cluster (19 von 21) lagen dabei innerhalb von SSC bzw. SCC (Abb. 4.4 a-e).

Ergebnisse

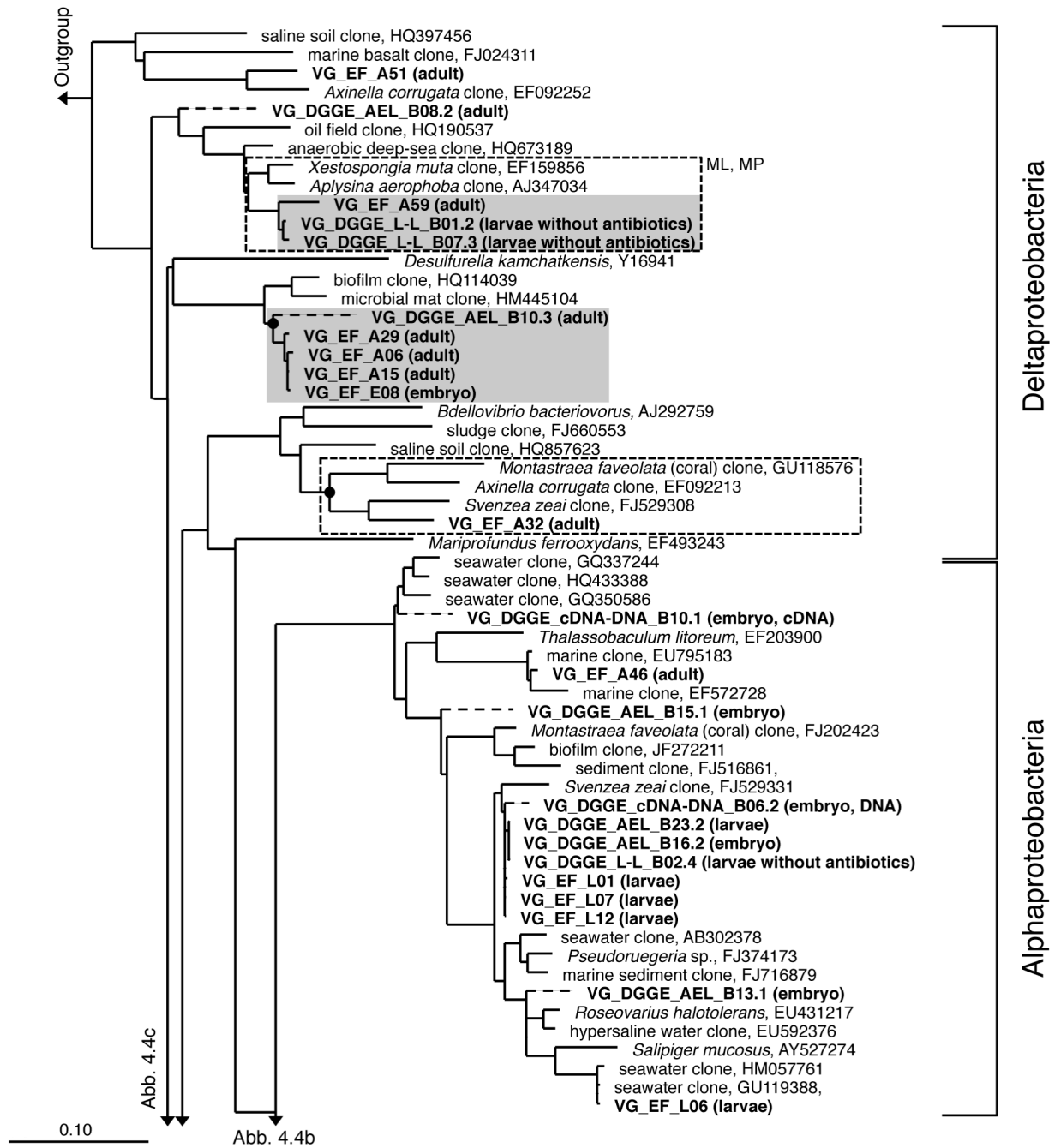


Abb. 4.4a: Phylogenetischer Maximum-Likelihood-Baum, der Alpha-, Delta-Proteobacteria (Abb.4.5a), Gamma-Proteobacteria (Abb. 4.5b), Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Nitrospira (Abb. 4.5c), Chloroflexi, Spirochaetes (Abb. 4.5d), sowie der Acidobacteria und der „sponge-associated unclassified lineage“ (Schwamm-assoziiertes unbekanntes Abstammung) SAUL (Abb. 4.5e). „Vertical transmission“ (VT) Cluster sind durch graue Kästen hervorgehoben, während offene gelassene Kästen „sponge-specific“ Cluster (SSC) oder, in Abhängigkeit des Vorhandenseins von bakteriellen Sequenzen die aus Korallen isoliert wurden, „sponge-coral“ Cluster (SCC). Die Sequenzcluster (nach der Definition von Hentschel *et al.* (2002)), die nur durch zwei von drei Berechnungsmethoden getragen wurden, wurden entsprechend mit ML=maximum likelihood und MP=maximum parsimony gekennzeichnet. Aus *E. ferox* isolierte 16S rRNA Gen Sequenzen wurden mit dem Präfix VG_EF in fett, sowie entsprechend dem für die Genbank-Konstruktion verwendeten Schwammmaterial mit den Buchstaben A=adult, E=Embryo und L=Larve gekennzeichnet. Sequenzen aus den DGGE-Experimenten erhielten die Kennung _DGGE, sowie die entsprechende Kennung der Experimente, AEL, L-L und cDNA-DNA. Die angegebenen Nummern entsprachen den ausgeschnittenen DGGE-Banden, wobei die erste Nummer nach dem Komma die Klonnummer angab, die zweite nach dem Komma die Sequenznummer sofern ein wiederholtes Sequenzieren des Klons notwendig war. *Fortsetzung unter Abb. 4.4b.*

Ergebnisse

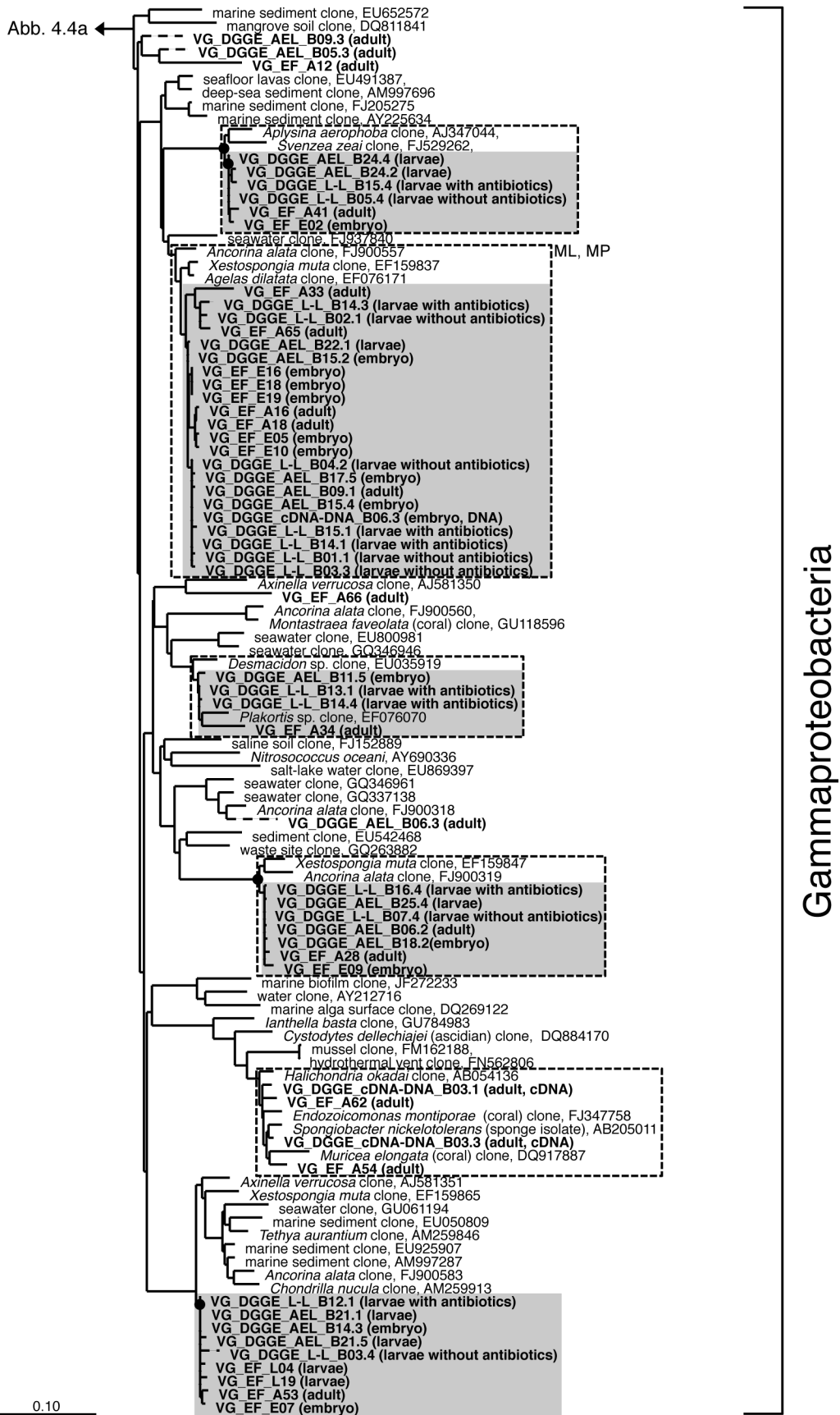


Abb. 4.4b: Fortsetzung von Abb. 4.4a. Für die relevanten Gruppen wurden die Bootstrap-Werte angegeben: Gefüllte Kreise > 95%, leere Kreise > 80%. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzdivergenz. Berechnung aller phylogenetischen Bäume: Dr. Susanne Schmitt (LMU-München), modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

Ergebnisse

Abb. 4.4a

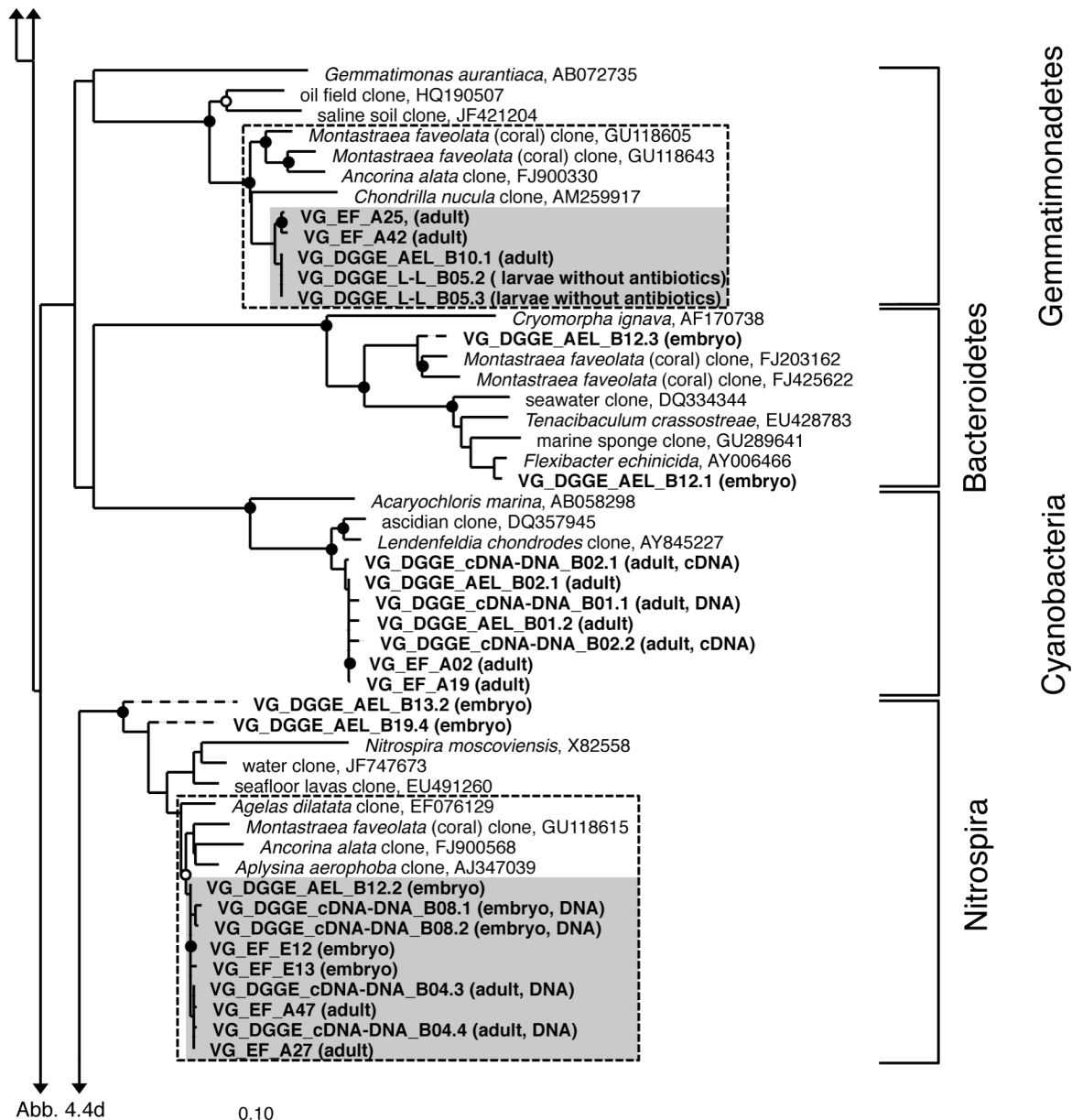


Abb. 4.4d

0.10

Abb. 4.4c: Siehe Abb. 4.4a und 4.4b.

Ergebnisse

Abb. 4.4c

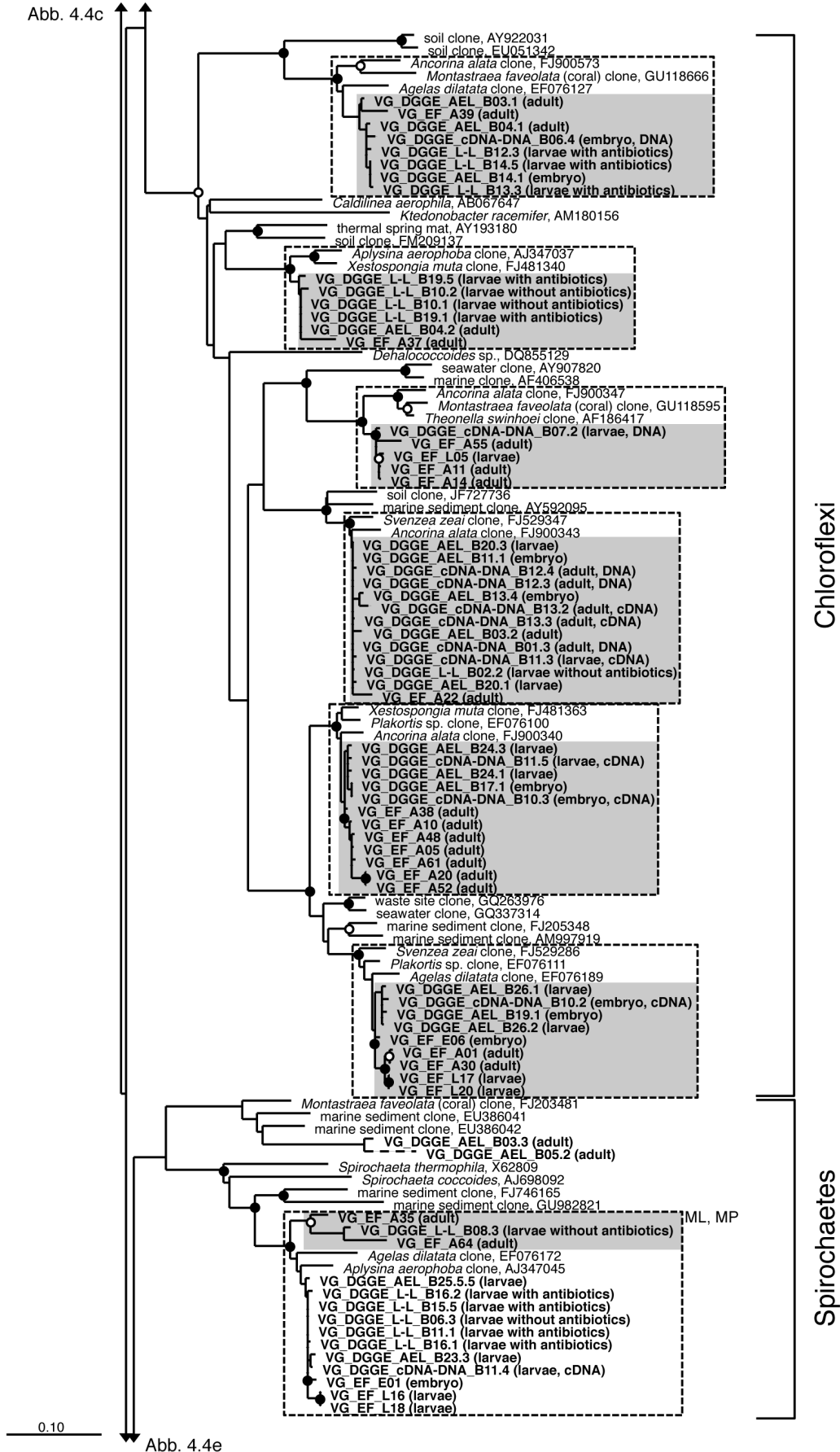


Abb. 4.4d: Siehe Abb. 4.4a und 4.4b.

Ergebnisse

Abb. 4.4d

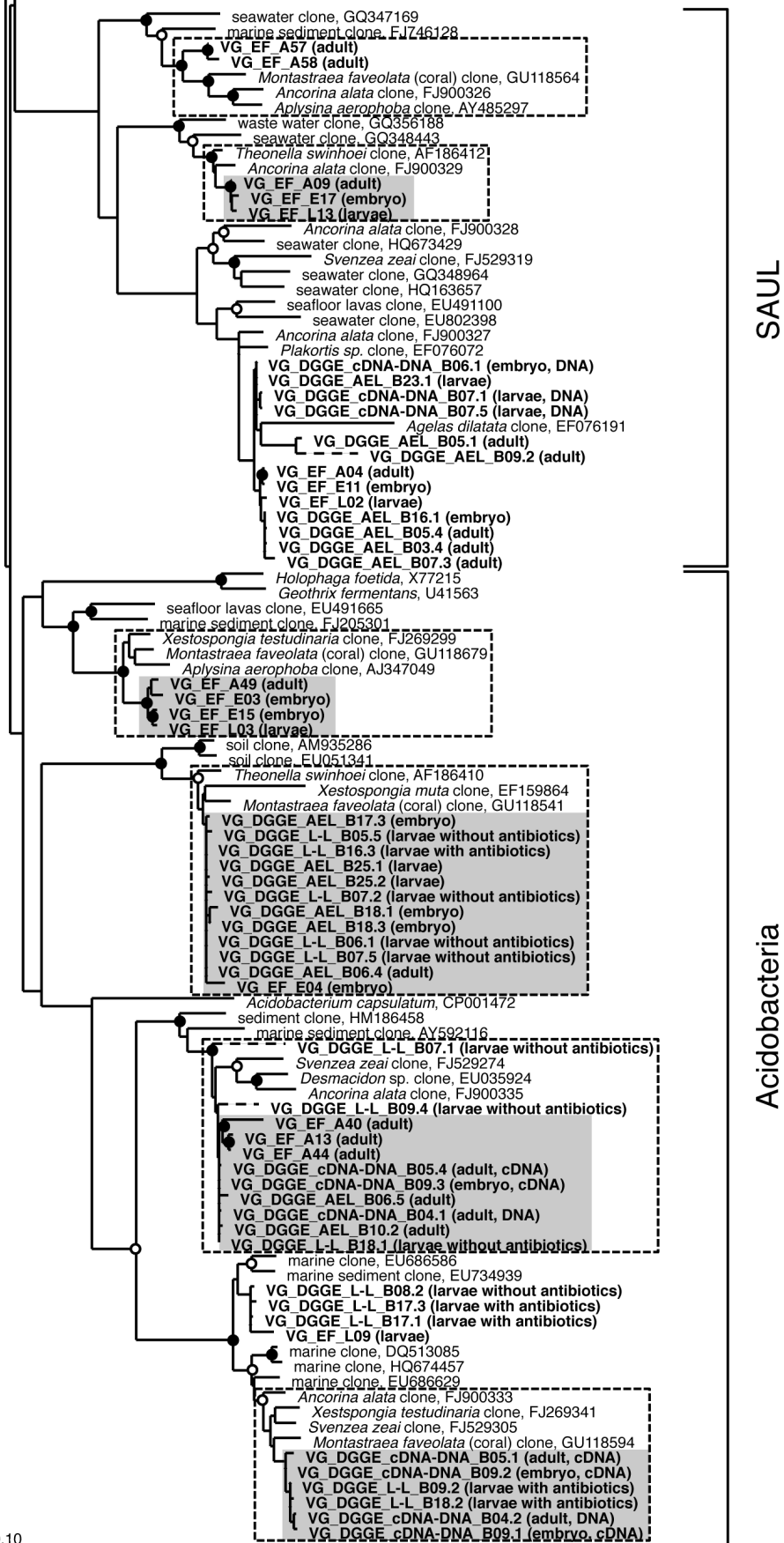


Abb. 4.4e: Siehe Abb. 4.4a und 4.4b.

Ergebnisse

Eine Clusteranalyse des DGGE-Bandenmusters ergab, dass die Muster der adulten Proben mit einer Ähnlichkeit von 85%, die der larvalen Proben mit 73% zusammenfielen, wobei beide im Dendrogramm deutlich voneinander getrennt waren. Die Muster der embryonalen Proben fielen sowohl mit denen der adulten wie auch mit denen der larvalen Proben zusammen (Abb. 4.5 A und B).

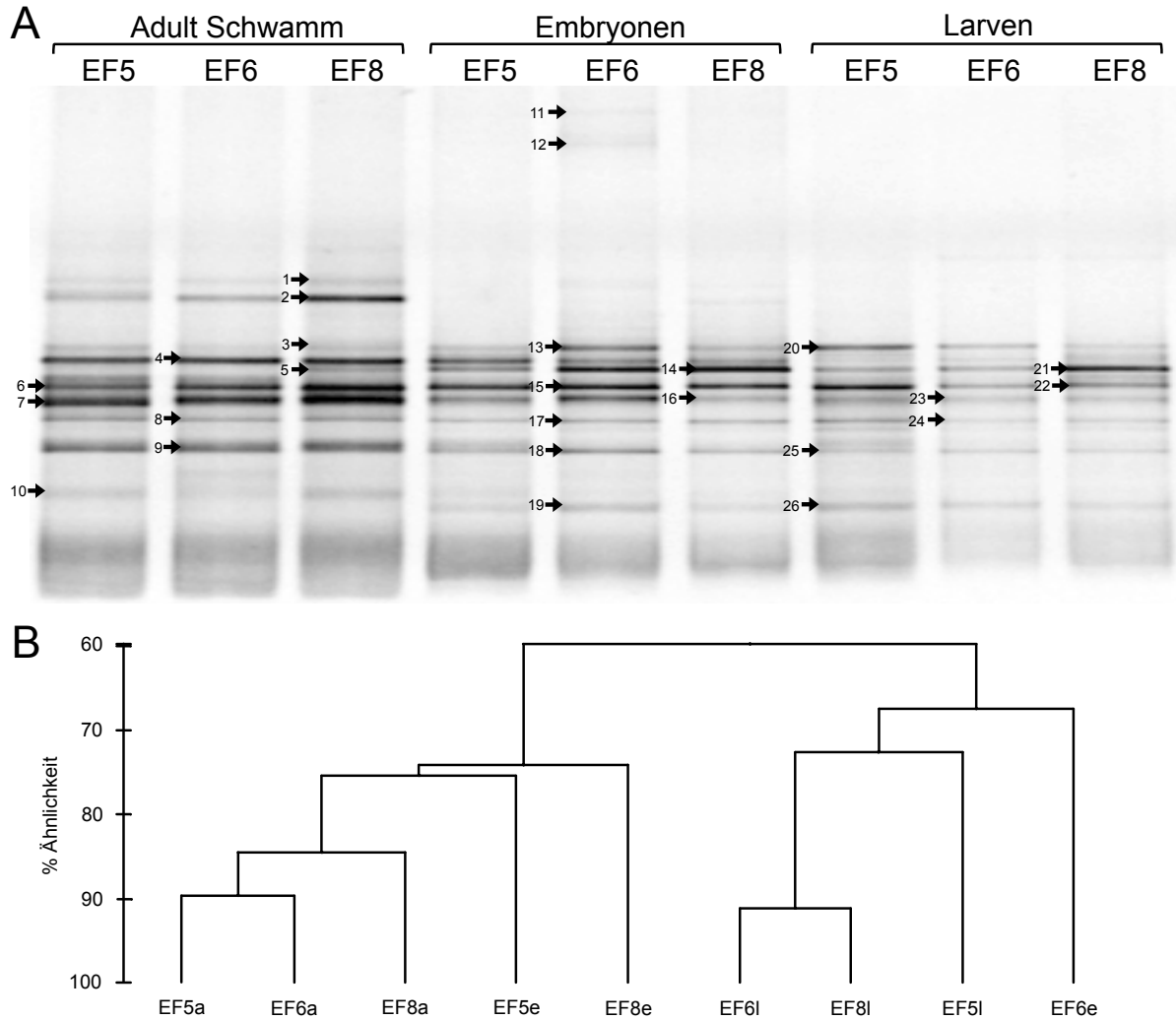


Abb. 4.5: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaften von Adult-Schwämmen, sowie von den korrespondierenden Embryonen und Larven (n=3), EF=*E. ferox*, Zahl=Nummer des Individuums, a=Adult-Schwamm, e=Embryo und l=Larve. Pfeile mit Zahlen zeigen ausgeschnittene und sequenzierte Banden. (A). Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenprofile (B). Die Beschriftung korrespondiert mit der in Abb. 4.4 A. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

Ergebnisse

4.1.5 Erstellung eines Aktivitätsprofils von Adult-, Embryonal- und Larval-Stadien

Um ein Aktivitätsprofil von *Ectyoplasia ferox* und dessen Reproduktionsstadien erstellen zu können, wurden die DGGE-Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaft auf 16S rRNA Gen-Ebene (Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft) mit der mikrobiellen Gemeinschaft auf 16S rRNA-Ebene (Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft) in den verschiedenen Entwicklungsstadien verglichen (Abb. 4.6). Diese Analysemethode beruhte auf der Annahme, dass die Stärke der Bande ein Indikator für die Häufigkeit des PCR-Produktes der 16S rRNA Gene bzw. 16S rRNA ist (Kamke *et al.* 2010). Die DGGE-Banden Nr. 1 und 2 waren cyanobakteriellen Ursprungs. Sie wurden ausschließlich im adulten Schwammmaterial gefunden, in dem sie auch metabolisch aktiv waren, wohingegen sie sowohl im embryonalen wie auch in larvalen Material vollständig fehlten. Allgemein ließ sich feststellen, dass die meisten Banden, die in der DNA-Spur vorhanden waren, auch in der RNA-Spur gefunden wurden, was den Schluss zulässt, dass die Mehrzahl der mikrobiellen Phylotypen in den verschiedenen Entwicklungsstadien metabolisch aktiv waren. Die Ergebnisse der Clusteranalyse der Bandenmuster waren in sich widersprüchlich und wurden hier deshalb nicht gezeigt.

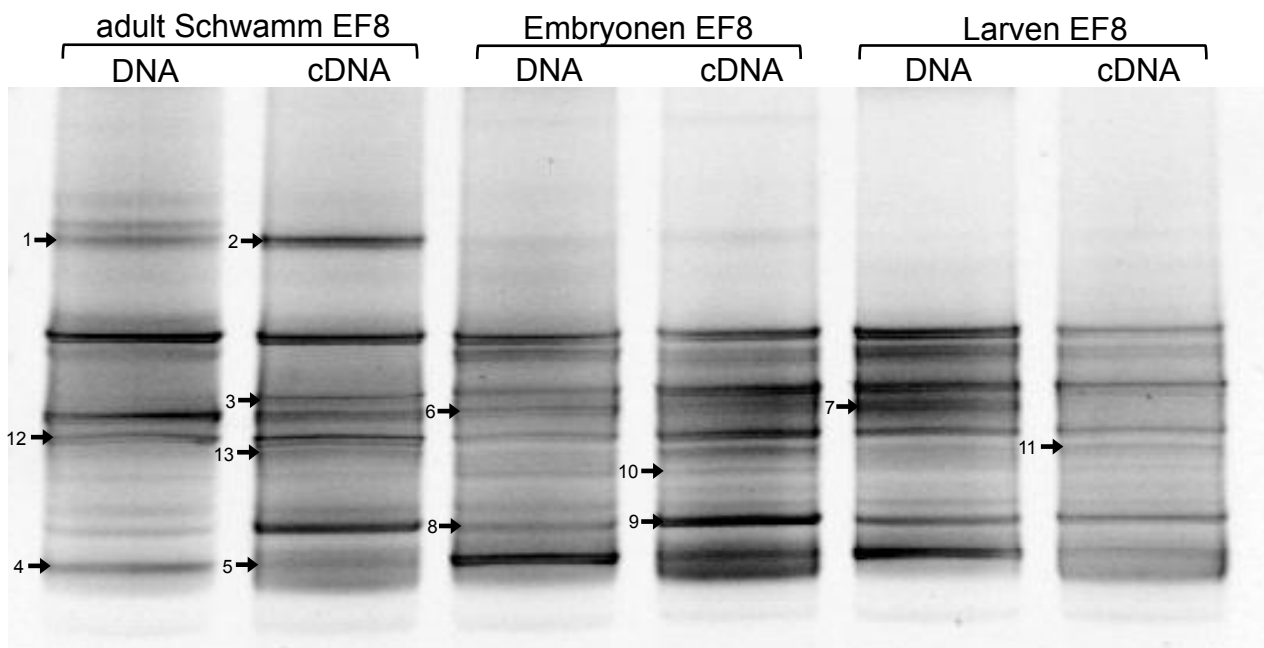


Abb. 4.6: DGGE-Bandenprofile der 16S rRNA Genen (DNA) und 16S rRNA (cDNA). EF8=*E. ferox* Individuum Nr. 8, Pfeile mit Zahlen zeigen ausgeschnittene und sequenzierte Banden. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

4.1.6 Antibiotika-Behandlung von Schwammlarven zur Erzeugung symbiontenfreier Juvenil-Schwämme

Um symbiontenfreie Juvenil-Schwämme zu erzeugen, wurden mehrere hundert Schwammlarven für vier Tage mit Antibiotika behandelt. Anschließend wurde mittels DGGE die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft von Larven mit Antibiotikabehandlung und ohne Antibiotikabehandlung verglichen. Dabei konnte eine starke Reduzierung der DGGE-Bandenmuster nach der Behandlung mit Antibiotika beobachtet werden, wobei die Larven während der 4-tägigen Antibiotikabehandlung nicht vollständig von ihren mikrobiellen Symbionten befreit werden konnten. Die DGGE-Banden 13 und 14, beide im SSC der Gamma-Proteobacteria, stellen zum Beispiel Phylotypen dar, deren DGGE-Banden auch nach der Antibiotikabehandlung deutlich zu erkennen waren. Trotz der visuellen Abnahme der Bandenstärke wurden die meisten Banden sequenziert und phylogenetisch analysiert. Die Petrischalen mit den verbliebenen Larven wurden im Diadema Riff an Betonblöcken befestigt, wo sie ein Jahr später wieder eingesammelt wurden. Leider konnte nur von einer Kontrollgruppe ein Adult-Schwamm gewonnen werden, der für weitere Untersuchungen unbrauchbar war, da das Schwammmaterial nicht von den überwucherten Algen und Bryozoen getrennt werden konnte.

Ergebnisse

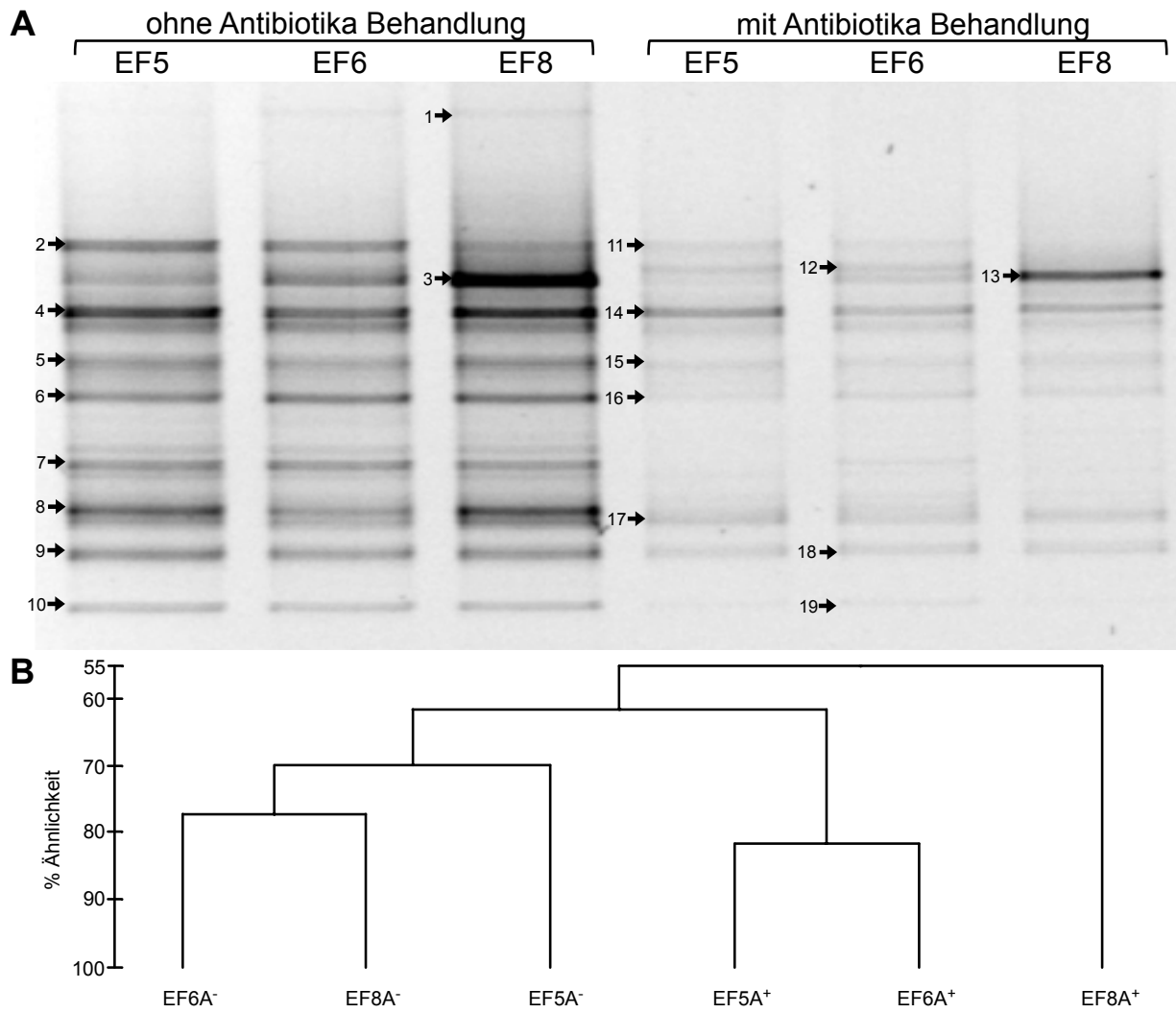


Abb. 4.7: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaften der Schwammlarven (n=3) mit und ohne Antibiotika-behandlung. EF=*E. ferox*, Ziffer=Nummer des Individuums, a=Adult-Schwamm, e=Embryo und l=Larve. Pfeile mit Zahlen zeigen ausgeschnittene und sequenzierte Banden (A). Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenprofile (B). Die Beschriftung korrespondiert mit der in Abb. 4.7 A, minus=ohne Antibiotikabehandlung, plus=mit Antibiotikabehandlung. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012b).

4.2 Untersuchung zur mikrobiellen Diversität von Schwämmen der Gattung *Oscarella*

4.2.1 Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität verschiedener Schwammarten mittels DGGE

Um die mikrobielle Diversität in verschiedenen *Oscarella*-Arten zu beschreiben und untereinander zu vergleichen, wurden fünf mediterrane *Oscarella*-Arten (*O. lobularis*, *O. viridis*, *O. microlobata*, *O. balibalo*, *O. tuberculata*) mittels DGGE untersucht. Das DGGE-Bandenmuster von zwei Individuen derselben Art, mit Ausnahme von *O. balibalo*, wiesen nur geringe Unterschiede auf. Das Bandenmuster von *O. balibalo* (Abb. 4.8 A) und folglich dessen mikrobielle Gemeinschaft schien variabler als die der anderen untersuchten *Oscarella*-Arten zu sein. Beim Vergleich der Bandenmuster zwischen den verschiedenen *Oscarella*-Arten konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese sich deutlich voneinander abgrenzten. Der auffälligste Unterschied fand sich bei *O. tuberculata*, dessen Bandenmuster aus nur zwei Banden bestand. Die untere der Banden wurde für beide Individuen aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert (Bande 9-10, Abb. 4.8 A). Die erhaltenen Sequenzen fielen mit den Actinobacteria und den Alpha-Proteobacteria zusammen (Abb. 4.9b). Des Weiteren wurden die untersten Banden ausgeschnitten und sequenziert, die bei den vier verbliebenen *Oscarella*-Arten auf derselben Höhe zu liegen schienen (Banden 1-8, Abb. 4.8 A). Die Sequenzen unterschieden sich jedoch deutlich voneinander und waren mit Actinobacteria, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes, sowie mit Alpha-, Gamma- und Delta-Proteobacteria assoziiert (Abb. 4.9a). Weiterhin zeigte die Clusteranalyse der Bandenmuster, dass die beiden Proben derselben Schwammarten untereinander ähnlicher waren als zu anderen *Oscarella*-Arten (Abb. 4.8 B). Um das Bandenmuster der LMA-*Oscarella*-Schwämme mit dem eines HMA-Schwammes vergleichen zu können, wurde der mediterrane HMA-Schwamm *Aplysina aerophoba* herangezogen. *A. aerophoba* zeigte ein Bandenmuster mit weniger Banden im oberen Bereich (GC-ärmer), dafür aber mit deutlich mehr Banden im unteren Bereich (GC-reicher) und damit ein ganz anderes Bandenmuster, als das der untersuchten *Oscarella*-Schwämme. Der Unterschied wurde nochmals im Dendrogramm der Clusteranalyse deutlich (Abb. 4.8 B), in der die Ähnlichkeit des HMA-Schwammes *A. aerophoba* zu den LMA *Oscarella* Schwämmen bei nur 4% lag.

Ergebnisse

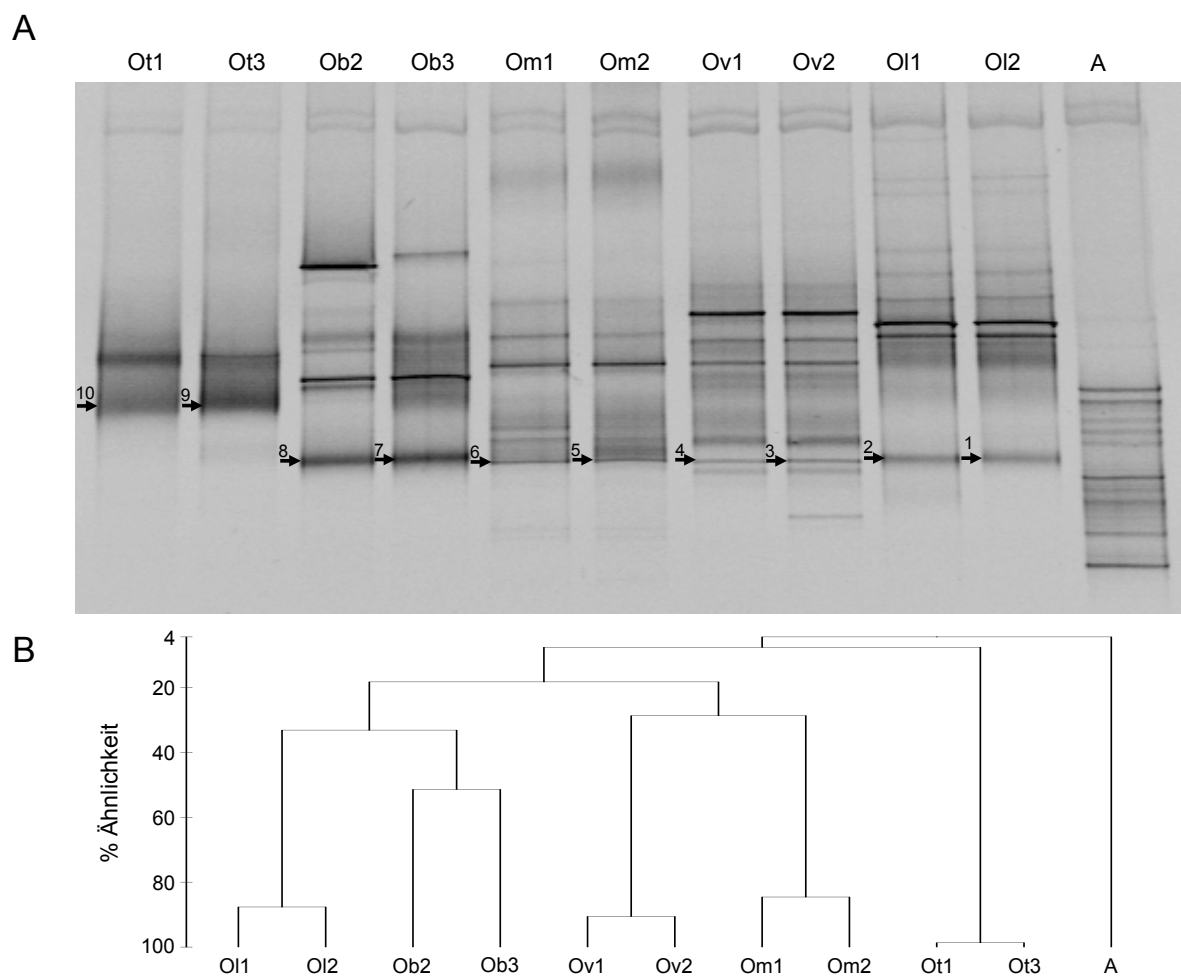


Abb. 4.8: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaften der verschiedenen *Oscarella* Schwämme. OI=*O. lobularis*, Ob=*O. balibalo*, Ov=*O. viridis*, Om=*O. microlobata*, Ot=*O. tuberculata* und A=*Aplysina aerophoba*. Pfeile mit Zahlen zeigen ausgeschnittene und sequenzierte Banden, Ziffer die Nummer des Schwammindividuum (A). Clusteranalyse (UPGMA) der DGGE-Bandenprofile, Ähnlichkeit in Prozent angegeben (B). Die Beschriftung korrespondiert mit der in Abb. 4.8 A. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012a).

4.2.2 Erstellung einer 16S rRNA-Genbank für *Oscarella lobularis*

Um die verschiedenen Bakterien der mikrobiellen Gemeinschaft des Modellschwammes *Oscarella lobularis* (Ereskovsky *et al.* 2009) zu identifizieren, wurde eine 16S rRNA Genbank erstellt. Nach einer RFLP-Analyse und der Überprüfung der Daten auf Chimären oder Sequenzen geringer Qualität verblieben 25 hochqualitative Vollsequenzen. Diese Sequenzen konnten folgenden bakteriellen Phyla zugeordnet werden: Verrucomicrobia (n=4), Gamma-Proteobacteria (n=3) und den Bacteroidetes (n=2) (Abb. 4.9a). Alle übrigen Sequenzen (n=16) fielen in das Phylum der Alpha-Proteobacteria (Abb. 4.9b). Die phylogenetischen Analysen bestätigten somit, dass es sich bei *O. lobularis* um einen LMA-Schwamm handelt.

Ergebnisse

Sequenzen der 16S rRNA-Genbank fielen in der phylogenetischen Analyse mit drei der vier Sequenzen aus der DGGE-Analyse von *O. lobularis*, wie auch mit DGGE-Sequenzen von *O. balibalo* und *O. microlobata*, aber nicht mit DGGE-Sequenzen von *O. tuberculata* oder *O. viridis* zusammen.



Abb. 4.9a: Phylogenetischer maximum likelihood Baum basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen, welche aus den verschiedenen *Oscarella*-Arten isoliert wurden. Fortsetzung siehe Abb. 4.9b.

Ergebnisse

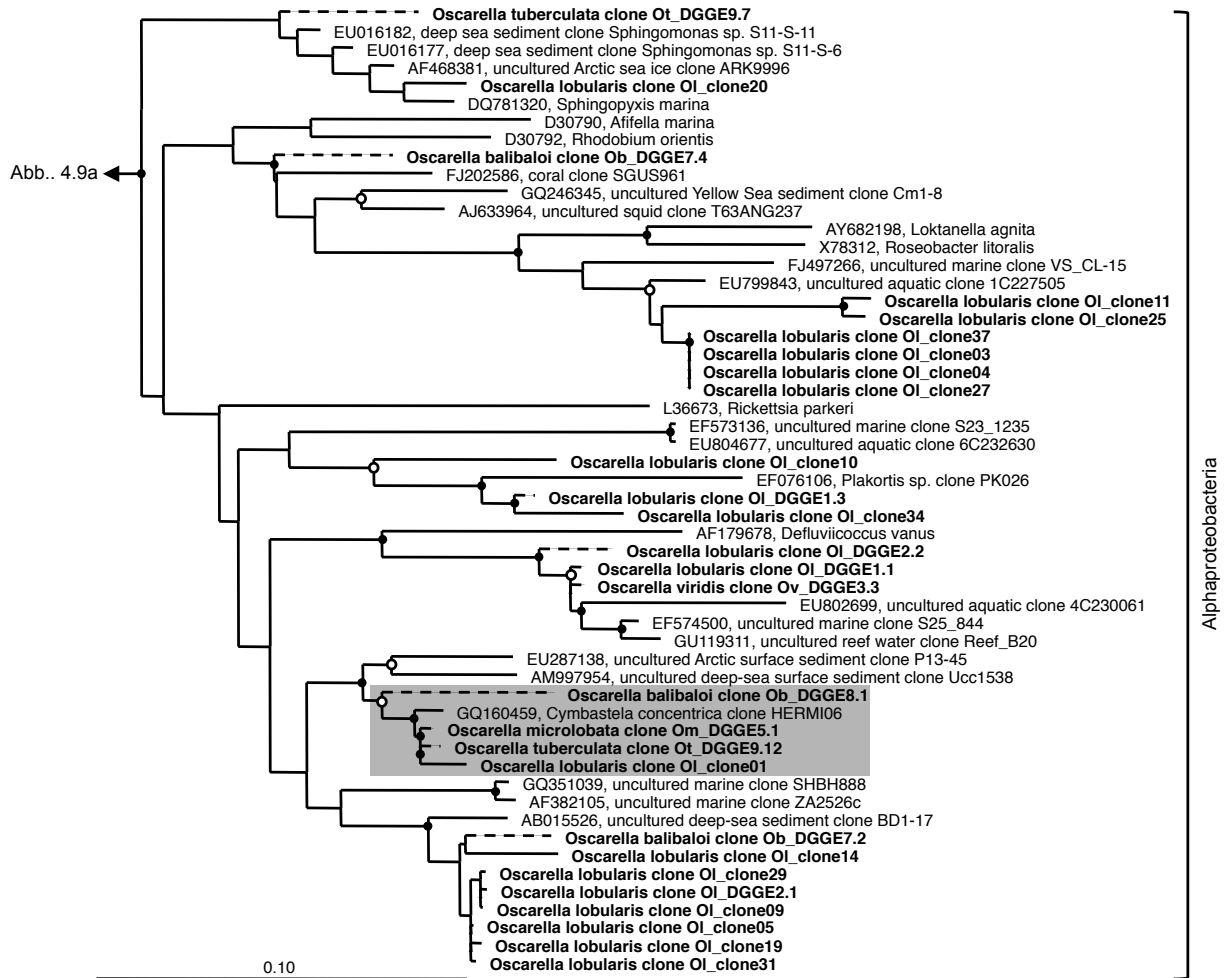


Abb. 4.9b: Fortsetzung von Abb. 4.9a. Vollsequenzen der *Oscarella lobularis* Genbank tragen das Präfix „OL-clone“ gefolgt von der Klonnummer. Jede Sequenz repräsentiert ein einzigartiges RFLP-Muster. Die Ziffer hinter dem Klonnamen zeigt an, wenn ein RFLP-Muster mehr als eine Sequenz beinhaltet und entspricht so der Sequenznummer. Aus DGGE-Banden erhaltene Teilsequenzen tragen die Abkürzung der korrespondierenden Schwammarten Ol=*O. lobularis*, Ob=*O. balibaloii*, Ov=*O. viridis*, Om=*O. microlobata*, Ot=*O. tuberculata*, gefolgt von der Bandennummer (Abb. 4.8 A) sowie der Klonnummer. Gestrichelte Linien markieren Teilsequenzen (<1200bp). „Sponge-specific“ Cluster (nach der Definition von Hentschel *et al.* 2002) sind durch graue Boxen hervorgehoben. Gefüllte Kreise zeigen für die relevanten Gruppen Bootstrap-Werte von > 95%, leere Kreise > 80% an. Der Maßstab entspricht 10% Sequenzdivergenz. Berechnung der phylogenetischen Bäume: Dr. Susanne Schmitt (LMU-München), modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012a).

4.2.3 Beschreibung bakterieller Morphotypen in verschiedenen *O. lobularis* Farbvariationen

O. lobularis ist im Mittelmeer in den Farbvariationen rosa, violett, elfenbeinfarben, blau sowie in hellblau verbreitet (Abb. 4.10 b1-4). Im Folgenden wurde von Dr. Alexander Ereskovsky mittels TEM untersucht, inwieweit die verschiedenen Farbvariationen von *O. lobularis* auch unterschiedliche bakterielle Morphotypen beherbergten. In jedem der untersuchten Schwämme waren dieselben vier Morphotypen, extrazellulär im Mesohyl liegend, vorhanden (Abb. 4.10 b1-4).

Der erste Morphotyp besaß eine ovoide Form, ca. 0,8 µm im Durchmesser, mit einer Länge von 1,5 µm. Die Zelle war umgeben von zwei Membranen mit einem Zwischenraum von ca. 80 nm (Abb. 4.10 b1 in B, E, H, K, N). Der zweite Morphotyp hatte eine Stäbchenform, einen Durchmesser von 0,6 µm und war ca. 1,2-2,2 µm lang. Der Nucleoid war filamentös, wobei die Zelle von einer äußeren Membran umgeben war, in der schwarze Punkte eingebettet waren (Abb. 4.10 b2 B, E, H, K, N). Der dritte Morphotyp besaß wiederum eine Stäbchenform mit einem Durchmesser von ca. 0,2 µm und einer Länge von 0,9-2,0 µm sowie einer gramnegativen Zellwand. Der Nucleoid hatte das Aussehen eines filamentösen Netzwerkes mit einem zentralen, schmalen Kern (Abb. 4.10 b3 B, E, H, K, N). Der vierte Morphotyp hingegen hatte eine Kugelform mit einem Durchmesser von ca. 0,44-0,5 µm, einen schwach filamentösen Nucleoid und einer Doppelmembran (Abb. 4.10 b4 B, E, H, K, N). Es konnten keine offensichtlichen Unterschiede hinsichtlich Quantität und Verteilung der vier Morphotypen zwischen den verschiedenen Farbvariationen festgestellt werden (Abb. 4.10 C, F, I, L, O).

Ergebnisse

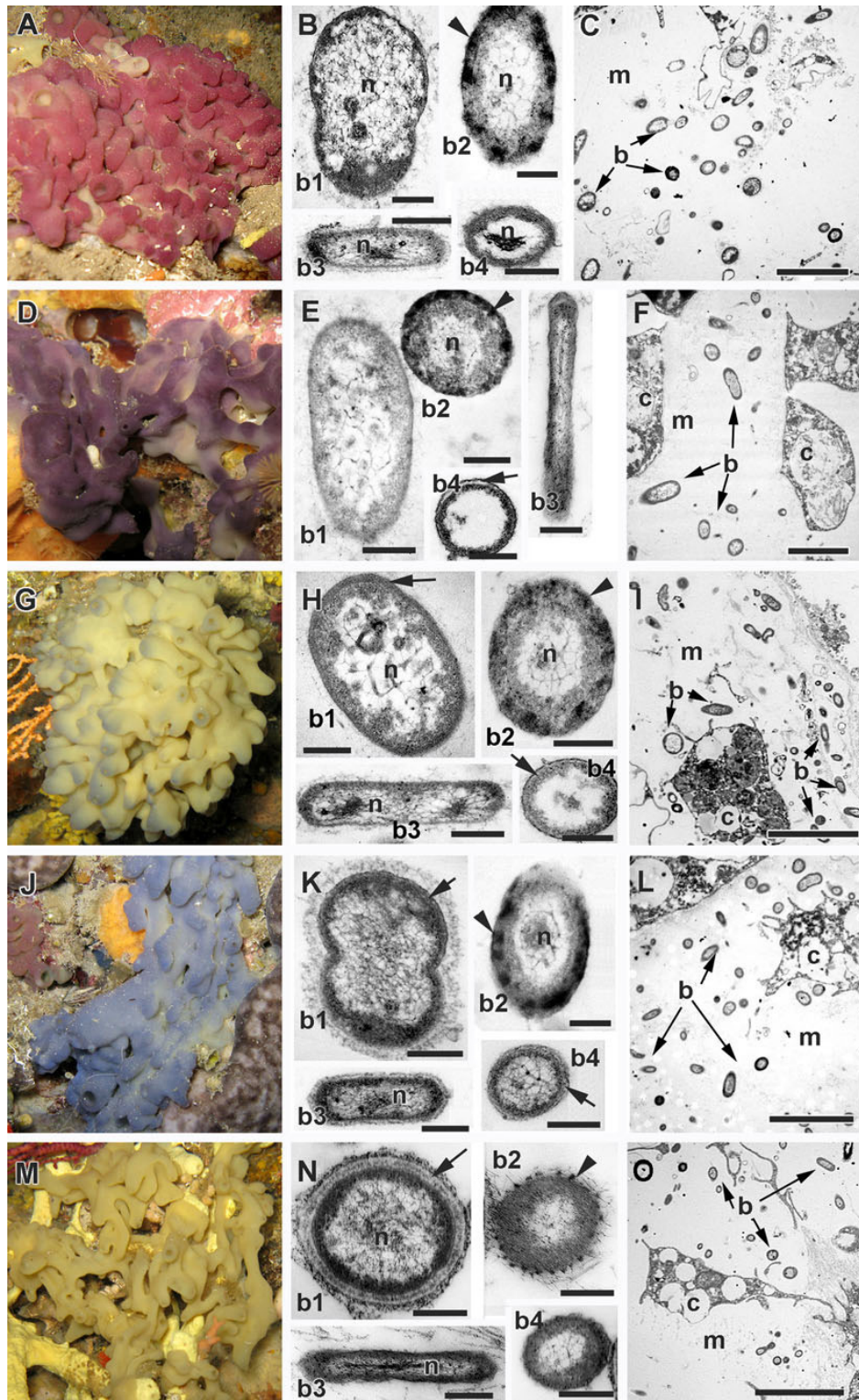


Abb. 4.10: Untersuchung der unterschiedlichen bakteriellen Morphotypen in den verschiedenen *Oscarella lobularis* Farbvariationen, rosa (A-C), violett (D-F), hellblau (G-I), blau (J-L) und elfenbeinfarben (M-O). Unterwasserfotographien der verschiedenen Farbvariationen (A, D, G, J, M linke Spalte), TEM-Aufnahmen der verschiedenen bakteriellen Morphotypen (B, E, H, K, N mittlere Spalte) sowie von der bakteriellen Abundanz und Verteilung im Schwammesohyl (C, F, I, L, O rechte Spalte) b=Bakterien, c=Schwammzelle, m=Mesohyl, n=Nucleoid. Die vier verschiedenen bakteriellen Morphotypen sind mit b1, b2, b3 und b4 gekennzeichnet. Pfeile markieren Doppelmembranen, Pfeilspitzen zeigen schwarze Punkte in der Membran in b2. Maßstab: B, E, H, K, N = 3µm, C, F, I, L, O = 6µm. Alle Aufnahmen: Dr. Alexander Ereskovsky. Abbildung aus Gloeckner *et al.* (2012a).

Ergebnisse

4.2.4 Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität in verschiedenen *O. lobularis* Farbvariationen mittels DGGE

Die DGGE-Bandenmuster der in Kapitel 4.2.3 behandelten Schwämme (Abb. 4.11 A) wiesen in Übereinstimmung mit den morphologischen Ergebnissen eine sehr hohe Ähnlichkeit untereinander auf. So waren die DGGE-Bandenmuster von zwei Individuen derselben Farbvariante nicht zwangsweise ähnlicher zueinander, als zu den Bandenmuster einer anderen Farbvariante (z.B. die violetten Farbvarianten Individuum OI1 und OI2, Abb. 4.11 B). Das Bandenmuster von *A. aerophoba*, das hier abermals zum Vergleich herangezogen wurde, unterschied sich deutlich von dem der *O. lobularis*-Schwämme.

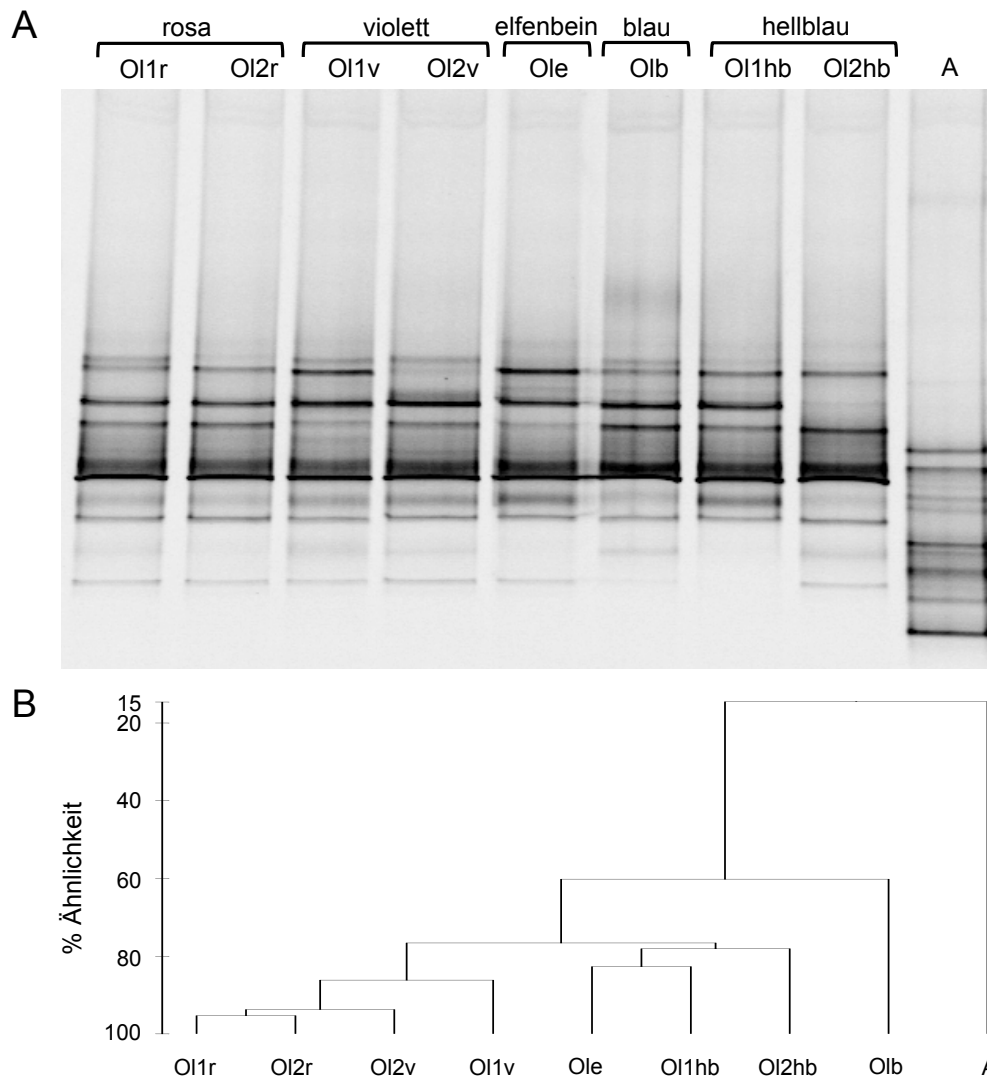


Abb. 4.11: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaften von *Oscarella lobularis* (OI) und dessen verschiedener farblicher Variationen, r=rosa, v=violette, e=elfenbeinfarben, hb=hellblau und b=blau, A= *Aplysina aerophoba*. Ziffern zeigen die Nummer des Schwammindividuums an (A). Clusteranalyse der DGGE-Bandenprofile, Ähnlichkeit in Prozent angegeben (B). Die Beschriftung korrespondiert mit der in Abb. 4.11 A. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012a).

4.2.5 Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften von *O. lobularis* aus unterschiedlichen Standorten und Meerestiefen

Um herauszufinden, ob es Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft von *O. lobularis* (rosa Farbvariation) von verschiedenen Standorten und aus unterschiedlichen Meerestiefen gibt, wurden diese mittels DGGE untersucht und verglichen. Insgesamt ähnelten sich die bakteriellen Gemeinschaften in sämtlichen Proben sehr (Abb. 4.12 A). Die natürlichen Replikat eines Standortes und derselben Meerestiefe fielen in der Analyse der DGGE-Bandenmuster immer zusammen, wobei die Proben gleicher Meerestiefe, entweder 8 m oder 22-23 m, nicht zwangsläufig ein Cluster bildeten. Auch Proben vom selben Standort, aber unterschiedlicher Meerestiefe (Insel Frioul, 8 m und 23 m), hatten im Dendrogramm unterschiedliche Positionen (Abb. 4.12 B). Am ähnlichsten waren die bakteriellen Gemeinschaften in den Schwämmen von der Insel Rio Sud (22 m) und von der Insel Maire (8 m). Die bakterielle Gemeinschaft von *A. aerophoba* unterschied sich wiederum deutlich von denen der untersuchten *Oscarella*-Schwämme.

Ergebnisse

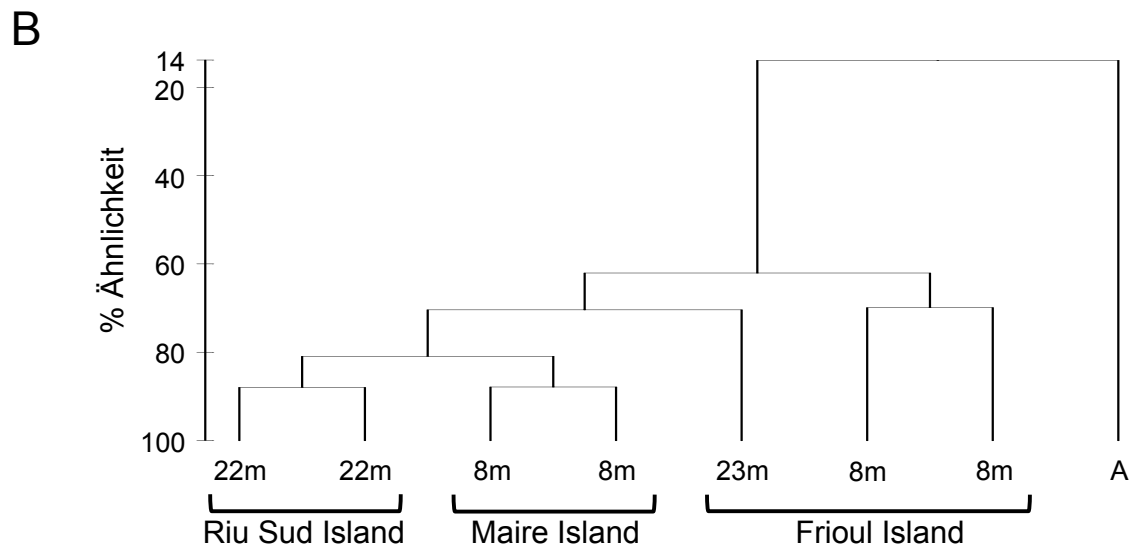
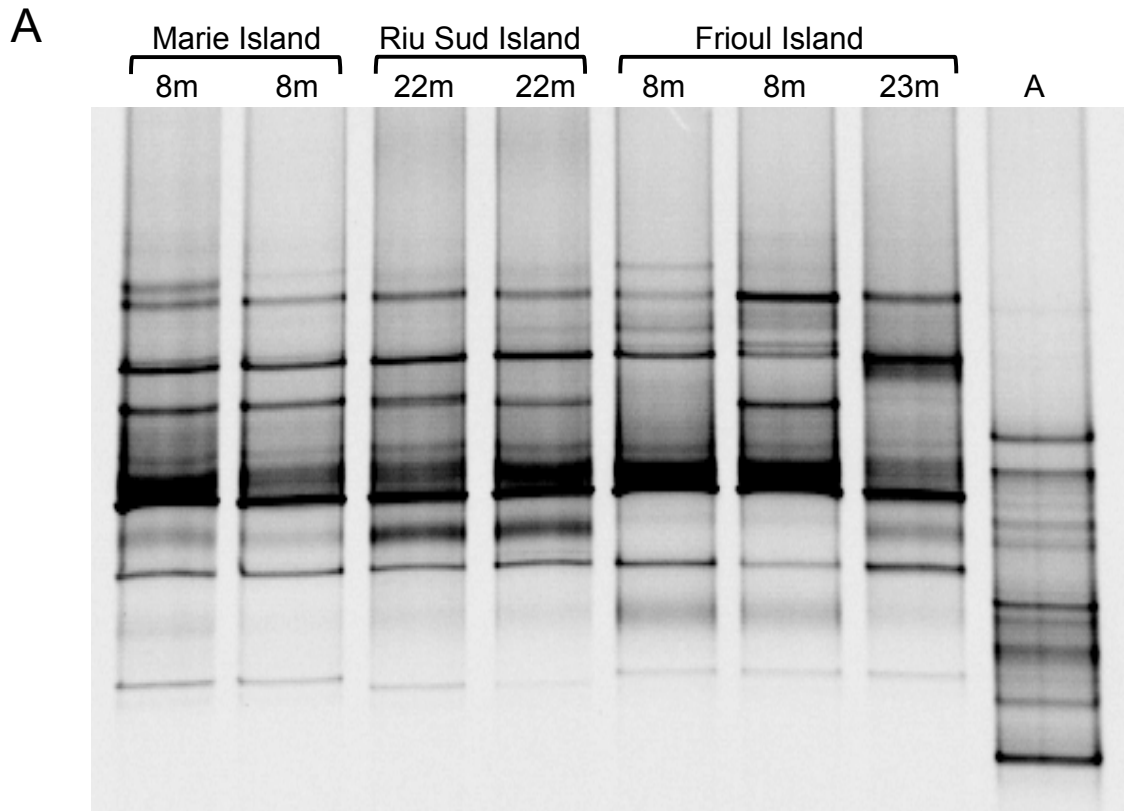


Abb. 4.12: DGGE-Profile der bakteriellen Gemeinschaften von *Oscarella lobularis* (Ol) von 3 verschiedenen Standorten (Insel Riu Sud, Insel Marie und der Insel Frioul) und Meerestiefen (22m, 23m und 8m). A= *Aplysina aerophoba*. Modifiziert nach Gloeckner *et al.* (2012a).

4.3 Untersuchungen zur Bakterienhaltigkeit verschiedener karibischer Schwämme

4.3.1 Einteilung in HMA/LMA mittels DAPI-Zählungen

Im Folgenden wurde untersucht inwieweit sich unterschiedliche Methoden zur Einteilung der verschiedenen Schwämme in HMA und LMA eignen. Um einen möglichst schnellen Überblick über die Bakterienhaltigkeit der untersuchten Schwämme zu erhalten, wurden wie unter Kapitel 3.2.15 beschrieben Schwammextrakte hergestellt und mit DAPI gefärbt (Kapitel 3.2.17). Da hier nicht die genaue Anzahl an Bakterien pro Gramm Schwammmaterial interessiert, sondern nur ob die Schwämme bakterienhaltig (HMA) oder nicht-bakterienhaltig (LMA) waren, wurde anhand zweier Referenzextrakte, einmal des bekannten HMA-Schwammes *Aplysina fistularis* und des bekannten LMA-Schwammes *Callyspongia vaginalis*, eine plus-minus Einteilung vorgenommen. Demnach gehörten die Schwämme *Erylus formosus*, *Sphaciospongia vesparium*, *Mycale laxissima*, *Batzella rubra*, *Monanchora arbuscula*, *Ulosa ruetzleri*, *Callyspongia plicifera*, *Callyspongia vaginalis*, *Cinachyra alloclada* zu den sogenannten LMA-Schwämmen, während die Schwämme *Ectyoplasia ferox*, *Myrmekioderma gyroderma*, *Agelas dispar*, *Ircinia felix*, *Ircinia strobilina*, *Smenospongia aurea*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina fistularis*, *Verongula gigantea*, *Pseudoceratina crassa* den HMA-Schwämmen zugeordnet werden konnten (vgl. Tab. 4.1).

4.3.2 Einteilung in HMA/LMA mittels DGGE

Als eine weitere Methode zur Untersuchung der Bakterienhaltigkeit von Schwämmen wurde die DGGE herangezogen, wobei zwei Aspekte des DGGE-Bandenprofils entscheidend waren. Dies waren einmal die Anzahl an Banden, wobei diese abhängig war von dem verwendeten Gradienten im Gel und zweitens der GC-Gehalt der Sequenzen, der mit Hilfe des Standards (nur relatives Verhältnis) abgelesen werden konnte. Es mussten jeweils beide Kriterien für eine eindeutige Zuordnung zu HMA oder LMA gegeben sein. Folglich mussten für eine HMA-Zuordnung viele Banden vorhanden sein, die sich im Bereich eines hohen GC-Gehaltes bewegten. Für eine Zuordnung zu den LMA-Schwämmen wenige Banden im Bereich eines geringeren bis mittleren GC-Gehaltes. Wurden diese Kriterien auf die in Abb. 4.13 gezeigten

Ergebnisse

DGGE-Profile angewendet, so konnte man die folgenden Schwämme eindeutig den HMA-Schwämmen zuordnen: *Erylus formosus*, *Myrmekioderma gyroderma*, *Agelas clathrodes*, *Agelas dispar*, *Cribochalina vasculum*, *Xestospongia muta*, *Ircinia strobilina*, *Smenospongia aurea*, *Aplysina archeri*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina fistularis*, *Verongula gigantea*, *Cinachyra alloclada*. Zu den LMA-Schwämmen gehören *Mycale laxissima*, *Batzella rubra*, *Monanchora arbuscula* und ein nicht-identifizierter Schwamm. Widersprüchliche Ergebnisse erhielt man bei *Ulosa ruetzleri* mit wenig Banden, die sich aber über einen großen GC-Gehaltsgradienten verteilten, sowie für *Spheciospongia vesparium* mit wenig Banden, aber im Bereich eines hohen GC-Gehaltes. Bei *Iotrochota birotulata*, *Ectyoplasia ferox*, *Ptilocaulis sp.* und *Callyspongia plicifera* lag zu wenig PCR-Produkt vor, weshalb sie nicht in den Ergebnisteil mit eingingen (Abb. 4.13).

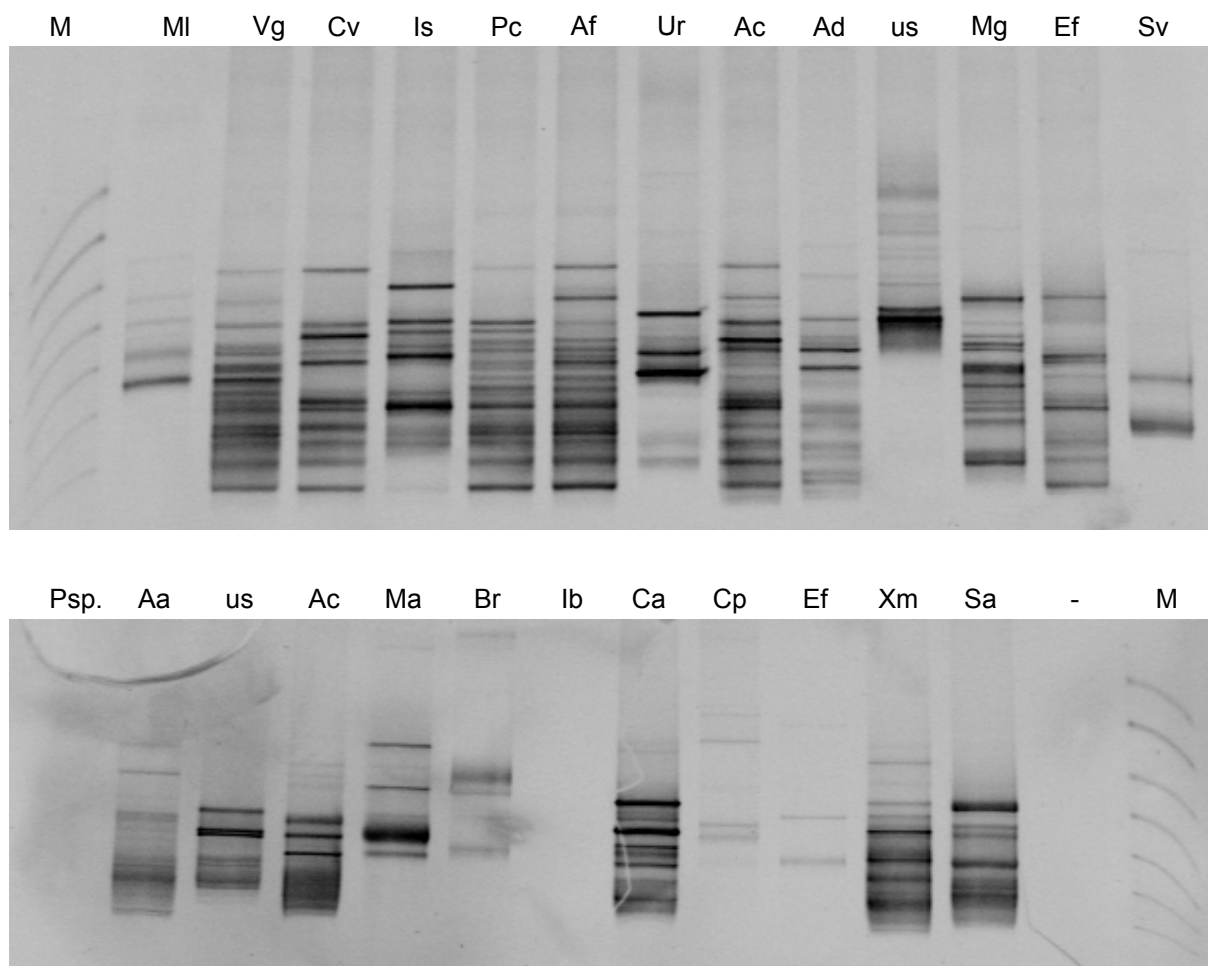
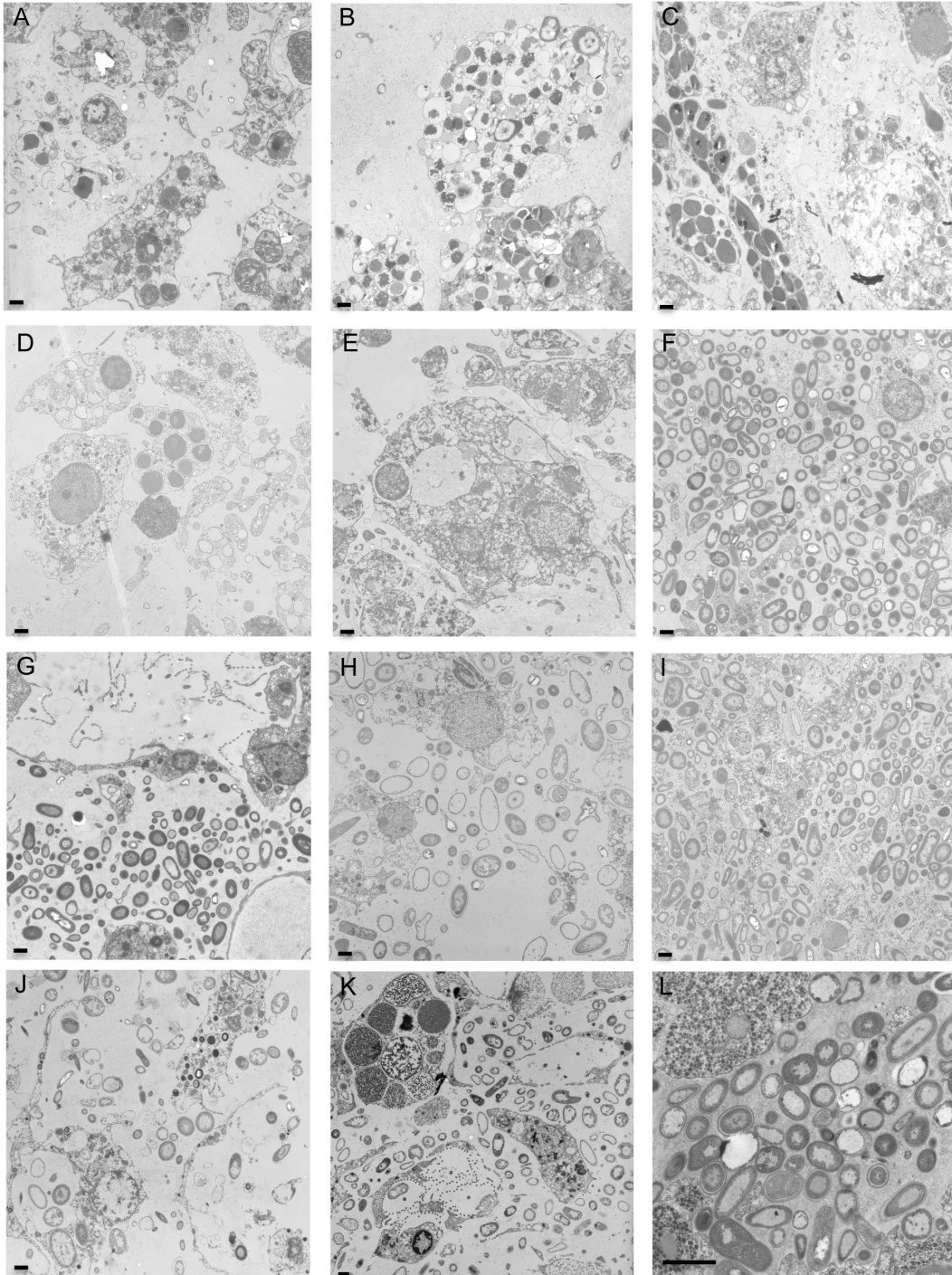


Abb. 4.13: DGGE-Bandenprofile der untersuchten karibischen Schwämme, MI=*Mycale laxissima*, Vg=*Verongula gigantea*, Cv=*Cribochalina vasculum*, Is=*Ircinia strobilina*, Pc=*Pseudoceratina crassa*, Af=*Aplysina fistularis*, Ur=*Ulosa ruetzleri*, Ac=*Aplysina cauliformis*, Ad=*Agelas dispar*, us=nicht identifizierter Schwamm, Mg=*Myrmekioderma gyroderma*, Ef=*Erylus formosus*, Sv=*Spheciospongia vesparium*, Psp.=*Ptilocaulis sp.*, Aa=*Agelas archeri*, us=nicht identifizierter Schwamm, Ac=*Agelas cathrodes*, Ma=*Monanchora arbuscula*, Br=*Batzella rubra*, Ib=*Iotrochota birotulata*, Ca=*Cinachyra alloclada*, Cp=*Callyspongia plicifera*, Ef=*Ectyoplasia ferox*, Xm=*Xestospongia muta*, Sa=*Smenospongia aurea*, -=Negativkontrolle, M=Marker. Abbildung: Volker Glöckner.

Ergebnisse

4.3.3 Einteilung in HMA/LMA mittels TEM

Die TEM liefert die eindeutigsten Ergebnisse um Schwämme anhand ihrer Bakterienhaltigkeit einzuteilen (Abb. 4.14). Demnach gehörten *Ulosa ruetzleri*, *Cinachyra alloclada*, *Erylus formosus*, *Batzella rubra* und *Monanchora arbuscula* zu den LMA-Schwämmen, während *Aplysina fistularis*, *Aplysina cauliformis*, *Myrmekioderma gyroderma*, *Smenospongia aurea*, *Agelas dispar* und *Pseudoceratina crassa* zu den HMA-Schwämmen gezählt werden konnten.



Ergebnisse

Abb. 4.14: TEM-Aufnahmen der untersuchten Schwämme. A=*Ulosa ruetzleri*, B=*Cinachyra alloclada*, C=*Erylus formosus*, D=*Batzella rubra*, E=*Monanchora arbuscula*, F=*Aplysina fistularis*, G=*Aplysina cauliformis*, H=*Myrmekioderma gyroderma*, I=*Sphaciospongia vesparium*, J=*Agelas dispar*, K=*Ectyoplasia ferox*, L=*Pseudoceratina crassa*. Maßstab entspricht 1 µm. TEM-Aufnahmen: Volker Glöckner.

4.3.4 Zusammenfassung der erhobenen Daten zu HMA- und LMA-Schwämmen

Zusammenfassend lassen sich auf Grundlage der hier erhobenen Daten sechs der untersuchten 23 Schwämme mit hoher Wahrscheinlichkeit zu den LMA-Schwämmen und neun zu den HMA-Schwämmen zählen.

Tab. 4.3.1: Tabellarische Übersicht der in dieser Doktorarbeit untersuchten Schwämme. Minus=Hinweis auf einen LMA Schwamm, plus=Hinweis auf einen HMA-Schwamm, minus/plus=widerrsprüchliche Hinweise auf HMA bzw. LMA. Wenn zwei von drei Methoden darauf hinweisen das es sich um einen HMA-Schwamm handelt wird dieser als HMA gewertet, bei LMA-Schwämmen entsprechend umgekehrt.

Klasse	Ordnung	Familie	Art	DAPI	DGGE	TEM	HMA/LMA	
Demospongiae	Astrophoridae	Geodiidae	<i>Erylus formosus</i>	-	+	-	LMA	
	Hadromerida	Clionidae	<i>Sphaciospongia vesparium</i>	-	/	+		
	Poecilosclerida	Mycalidae	<i>Mycale laxissima</i>	-	-	/	LMA	
			<i>Chondropsidae</i>	<i>Batzella rubra</i>	-	-	-	LMA
			<i>Crambeidae</i>	<i>Monanchora arbuscula</i>	-	-	-	LMA
			<i>Raspailidae</i>	<i>Ectyoplasia ferox</i>	/	/	+	
			<i>Esperiosidae</i>	<i>Ulosa ruetzleri</i>	-	-/+	-	LMA
			Halichondrida	Heteroxyidae	<i>Myrmekioderma gyroderma</i>	+	+	+
	Agelasida	Agelasiidae	<i>Agelas dispar</i>	+	+	+	HMA	
			<i>Agelas clathrodes</i>	/	+	/		
	Haplosclerida	Callyspongiidae	<i>Callyspongia vaginalis</i>	-	/	/		
			<i>Callyspongia plicifera</i>	-	/	/		
			<i>Cribochalina vasculum</i>	+	+	/	HMA	
			<i>Petrosidae</i>	<i>Xestospongia muta</i>	/	+	/	
	Dictyoceratida	Irciniidae	<i>Ircinia felix</i>	+	/	/		
			<i>Ircinia strobilina</i>	+	+	/	HMA	
			<i>Thorectidae</i>	<i>Smenospongia aurea</i>	+	+	/	HMA
	Verongida	Aplysinidae	<i>Aplysina archeri</i>	/	+	/		
			<i>Aplysina fistularis</i>	+	+	+	HMA	
			<i>Aplysina cauliformis</i>	+	+	+	HMA	
			<i>Verongula gigantea</i>	+	+	/	HMA	
			<i>Pseudoceratina crassa</i>	+	+	+	HMA	
	Spirophorida	Tetillidae	<i>Cinachyra alloclada</i>	-	+	-	LMA	

Ergebnisse

4.3.5 Zusammenfassung der Daten zu HMA- und LMA-Schwämmen der letzten Jahre

Fasst man die Daten, die in den letzten Jahren in der Arbeitsgruppe Hentschel zur Bakterienhaltigkeit von karibischen Schwämmen gesammelt wurden, zusammen, ergab sich folgendes Bild. Von 44 untersuchten Schwämmen konnten mit hoher Wahrscheinlichkeit 17 Schwämme den HMA- und 14 den LMA-Schwämmen zugerechnet werden. Bei den restlichen 13 Schwämmen war die Datenerfassung noch nicht vollständig abgeschlossen, bzw. es lagen widersprüchliche Ergebnisse vor.

Tab. 4.3.2: Tabellarische Übersicht der untersuchten Schwämme der letzten Jahre. Die Spalten fünf bis sieben beziehen sich auf die verwendeten Untersuchungsmethoden DAPI, DGGE und TEM. Minus=Hinweis auf einen LMA Schwamm, plus=Hinweis auf einen HMA-Schwamm, minus/plus=widersprüchliche Hinweise auf HMA bzw. LMA. Wenn zwei von drei Methoden darauf hinweisen das es sich um einen HMA-Schwamm handelt wird dieser als HMA gewertet, bei LMA-Schwämmen entsprechend umgekehrt.

Klasse	Ordnung	Familie	Art	DAPI	DGGE	TEM	HMA/LMA
Demospongiae	Astrophoridae	Geodiidae	<i>Erylus formosus</i>	-	+	-	LMA
			<i>Geodia neptuni</i>	+ ¹	/	/	
	Hadromerida	Clionidae	<i>Cliona varians</i>	- ²	/	/	
			<i>Sphaciospongia vesparium</i>	-	-	+	LMA
			<i>Sphaciospongia cuspidifera</i>	/	/	+ ³	
	Chondrosida	Chondrillidae	<i>Chondrilla collectrix</i>	+ ¹	/	/	
	Poecilosclerida	Iotrochotidae	<i>Iotrochota birotulata</i>	- ²	/	-	LMA
			<i>Mycalidae</i>	<i>Mycale laxissima</i>	-	-	-
		Chondropsidae	<i>Batzella rubra</i>	-	-	-	LMA
		Crambeidae	<i>Monanchora arbuscula</i>	-	-/+	-	LMA
		Raspaillidae	<i>Ectyoplasia ferox</i>	+	+	+	HMA
		Tedaniidae	<i>Tedania ignis</i>	- ²	- ²	- ³	LMA
		Esperiopsidae	<i>Ulosa fumicularis</i>	- ²	/	/	
			<i>Ulosa ruetzleri</i>	-	-/+	-	LMA
	Halichondrida	Axinellidae	<i>Ptilocaulis</i> sp.	- ²	/	- ³	LMA
		Heteroxyidae	<i>Myrmekioderma gyroderma</i>	+	+	+	HMA
	Agelasida	Agelasiidae	<i>Agelas citrine</i>	+ ²	/	/	
			<i>Agelas clathrodes</i>	+	+	/	HMA
			<i>Agelas dilatata</i>	+ ²	/	/	
			<i>Agelas dispar</i>	+	+	+	HMA
<i>Agelas wiedenmayeri</i>			/	/	+ ³		

¹ Thorsten Winter, wissenschaftliche Hilfskraft, ² Diplomarbeit Roswitha Schiller, ³ Dissertation Markus Wehrl (2006), ⁴ Dissertation Hilde Angermeier (2011), ⁵ Dissertation Susanne Schmitt (2007). Alle nicht weiter gekennzeichneten Ergebnisse wurden während dieser Dissertation erhoben. *Fortsetzung der Tabelle auf Seite 63.*

Ergebnisse

	Haplosclerida	<i>Callyspongiidae</i>	<i>Callyspongia plicifera</i>	-	/	/	
			<i>Callyspongia vaginalis</i>	-	- ²	- ³	LMA
		<i>Niphatidae</i>	<i>Amphimedon compressa</i>	- ²	- ⁴	- ⁴	LMA
			<i>Cribochalina vasculum</i>	+	+	+ ²	HMA
			<i>Niphates digitalis</i>	- ²	- ²	- ³	LMA
			<i>Niphates erecta</i>	/	/	- ³	
		<i>Chalinidae</i>	<i>Chalinula molitba</i>	- ²	/	- ³	LMA
		<i>Phloeodictyidae</i>	<i>Aka coralliphaga</i>	+ ²	+ ²	+ ²	HMA
			<i>Calyx podatypa</i>	+ ¹	/	/	
		<i>Petrosidae</i>	<i>Xestospongia muta</i>	+ ²	+	+ ³	HMA
	Dictyoceratida	<i>Irciniidae</i>	<i>Ircinia felix</i>	+	+ ⁵	+ ⁵	HMA
			<i>Ircinia strobilina</i>	+	+	/	HMA
		<i>Thorectidae</i>	<i>Smenospongia aurea</i>	+	+	+ ³	HMA
	Dendroceratida	<i>Dysideidae</i>	<i>Dysidia etheria</i>	- ²	/	/	
	Verongida	<i>Aplysinidae</i>	<i>Aplysina archeri</i>	+ ²	+	/	HMA
			<i>Aplysina cauliformis</i>	+	+	/	HMA
			<i>Aplysina fistularis</i>	+	+	+	HMA
			<i>Aplysina insularis</i>	+ ²	/	+ ³	HMA
			<i>Aplysina lacunosa</i>	/	/	+ ³	
			<i>Verongula gigantea</i>	+	+	+ ³	HMA
<i>Pseudoceratina crassa</i>			+	+	+	HMA	
Spirophorida	<i>Tetillidae</i>	<i>Cinachyra alloclada</i>	-	+	-	LMA	
Homosclerophorida	<i>Plakinidae</i>	<i>Plakortis</i> sp.	+ ²	+ ²	+ ²	HMA	

Fortsetzung von Tab. 4.3.2.: ¹ Thorsten Winter, wissenschaftliche Hilfskraft, ² Diplomarbeit Roswitha Schiller, ³ Dissertation Markus Wehr (2006), ⁴ Dissertation Hilde Angermeier (2011), ⁵ Dissertation Susanne Schmitt (2007). Alle nicht weiter gekennzeichneten Ergebnisse wurden während dieser Dissertation erhoben.

5 Diskussion

5.1 Vertikale Weitergabe von Schwammsymbionten in dem karibischen Modellschwamm *Ectyoplasia ferox*

Die vertikale Weitergabe von Symbionten konnte mittlerweile für eine Anzahl an Schwammarten mit Hilfe elektronenmikroskopischer, molekularer sowie phylogenetischer Studien belegt werden (Usher *et al.* 2001, Enticknap *et al.* 2006, Sharp *et al.* 2007, Schmitt *et al.* 2007b, Steger *et al.* 2008, Lee *et al.* 2009, Schmitt *et al.* 2011b, Hentschel *et al.* 2012, Gloeckner *et al.* 2012b). Ohne Zweifel spielt dieser Mechanismus eine entscheidende Rolle für die Ökologie und Evolution der Schwamm-Mikroorganismen-Interaktion. Trotz der Fortschritte auf diesem Gebiet mangelt es weiterhin an experimentellen Untersuchungen zur vertikalen Weitergabe von Schwamm-Symbionten. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Zum Einen ist es schwierig, den Zeitpunkt des „spawning“, wenn überhaupt bekannt, auf den Tag genau vorherzusagen, da nicht nur Mondphasen sondern auch die Temperatur der Meeresströmungen diesen beeinflussen. So war der Zeitpunkt des „spawning“ von *E. ferox* in 2009 nicht für den 10. September 2009, sondern für Ende August/Anfang September vorhergesagt, jedoch verschob eine ungewöhnlich kalte Meeresströmung im August das „spawning“ um einige Tage. Generell lässt sich zwar feststellen, dass viele der bis heute untersuchten Schwammarten in den wärmeren Sommermonaten reproduktiv aktiv sind (Hoppe 1988, Fromont und Berquist 1994, Maldonado und Riesgo 2008, Leong und Pawlik 2011), jedoch gestaltet sich die Feldarbeit auf Grund solcher nicht planbarer Ereignisse, zu denen auch tropische Stürme gehören, mitunter schwierig. Zum anderen kann man die Gameten oviparer Schwämme auf Grund ihrer geringen Größe nicht im umgebenden Meerwasser nachweisen. Ein Herauspräparieren z. B. der Oozyten aus dem Gewebe adulter Schwämme birgt das Risiko, dass die Mikroorganismen ursprünglich aus dem Adult-Gewebe stammten. Ähnlich kompliziert verhält es sich mit dem Sammeln der deutlich größeren Larven viviparer Schwämme aus dem umgebenden Meerwasser. Häufig werden die frühen Entwicklungsstadien der Larve verpasst und trotz sorgfältiger Verarbeitung der Proben kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Kontaminationen durch an der Larve anheftende Meerwasserbakterien einschleichen. Deshalb möchte ich in dieser Arbeit *Ectyoplasia ferox* als ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der vertikalen Weitergabe von Schwamm-Symbionten aus den folgenden Gründen vorstellen: Nach

Diskussion

der wahrscheinlich internen Befruchtung (ungewöhnlich für ovipare Schwämme und nicht offiziell bestätigt) wird das die Embryonen enthaltende „*spawning*“-Material (Abb. 4.1 A-C) durch die zahlreichen Osculi des Schwammes ausgeschieden. Dieses kann vergleichsweise einfach mittels einiger Tauchgänge gesammelt werden. Außerdem können die Larven durch Hälterung in steril filtriertem Meerwasser unter sterilen Laborbedingungen schlüpfen, was die Möglichkeit einer Kontamination durch Meerwasserbakterien weiter reduziert.

Wie mikroskopische Untersuchungen zeigten, kommen im Mesohyl von *E. ferox* Mikroorganismen in großer Häufigkeit vor (Abb. 4.2 A), was dessen Zuordnung zu den HMA-Schwämmen nach der Definition von (Hentschel *et al.* 2003) nochmals unterstreicht. Rasterelektronen mikroskopische Aufnahmen ließen auf eine perlenschnurartige Organisation der Embryonen schließen (Abb. 4.2 B). Leider konnte bis jetzt nicht vollständig geklärt werden, ob dieses Muster ein Artefakt der Fixierung und Dehydrierung der Proben für die Elektronen-Mikroskopie darstellt, oder ob es sich hierbei um die tatsächliche Struktur handelt. Allerdings bestärken lichtmikroskopische Aufnahmen (Abb. 4.1 C) in denen die Embryonen ähnlich angeordnet sind diese These. Beobachtungen im Feld zeigten außerdem, dass das „*spawning*“-Material in einer hohlen Spirale aus den Osculi ausgeschieden wird und sich erst später, wenn die Embryonen mit der sie umgebenden Matrix am Adult-Schwamm hängen bleiben, eine vermeintlich ungeordnete Struktur bildet. Zieht man dieses Material auf einem Glasobjektträger mit etwas Wasser in die Länge, so zeigt sich wieder die perlenschnurartige Organisation (Abb. 4.1 C), weswegen diese wahrscheinlich die Grundorganisation darstellt. Mit Hilfe der Lichtmikroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die Embryonen von *E. ferox* zahlreiche Ansammlungen von Mikroorganismen aufweisen (Abb. 4.2 C, D), welche später in den Larven extrazellulär im Zentrum lokalisiert waren (Abb. 4.2 E, F). Dass sich die Mikroorganismen auf das Innere der Larven konzentrierten, ist typisch für Larven der Demospongiae und Homoskleromorpha (Kaye 1991, Ereskovsky und Boury Esnault 2002, Ereskovsky *et al.* 2005, de Caralt *et al.* 2007, Maldonado 2007, Schmitt *et al.* 2008), sowie für Larven der Calcarea-Schwämme (Ereskovsky und Willenz 2008). Die offensichtliche Abnahme an Mikroorganismen während der Entwicklung vom Embryo zur Larve und deren Anreicherung im Zentrum der Larve ist wahrscheinlich auf zelluläre Umstrukturierungen während des larvalen Wachstums zurückzuführen (Abb. 4.2 F). Ein mikrobielles Wachstum im Larvenstadium scheint unwahrscheinlich, da sich teilende Mikroorganismen nicht gefunden wurden.

Diskussion

Im Gegensatz zur vertikalen Weitergabe von Schwammsymbionten ist die horizontale Aufnahme von Symbionten aus dem umgebenden Meerwasser weit weniger gut verstanden. Zwar konnte man Schwammsymbionten im Meerwasser nachweisen, was die Hypothese einer möglichen horizontalen Aufnahme unterstützt, allerdings waren diese nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden (Webster *et al.* 2010, Lee *et al.* 2011, Taylor *et al.* 2013). Die DGGE Banden Nr. 1 und 2 (Abb. 4.5) sind cyanobakteriellen Ursprungs und konnten nicht in den Larven von *E. ferox* nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sie wahrscheinlich auf horizontalem Wege aufgenommen wurden. Ob es sich hierbei um echte Schwammsymbionten handelt oder um Cyanobakterien die hauptsächlich im umgebenden Meerwasser vorkommen, bleibt offen.

In Oozyten von manchen HMA-Schwämmen fehlen Mikroorganismen vollständig (Maldonado 2007), was zu der Theorie führte, dass diese Schwämme ihre mikrobiellen Konsortien ausschließlich horizontal aufnehmen. Die derzeit vorherrschende Meinung geht mittlerweile von einer Kombination von vertikaler Weitergabe und horizontaler Aufnahme aus, welche die Ökologie und Evolution der Schwamm-Mikroorganismen-Gemeinschaften bestimmt (Schmitt *et al.* 2011b, Hentschel *et al.* 2012). Einige Aspekte der horizontalen Aufnahme bleiben jedoch noch ungeklärt. Zum Beispiel bleibt die Frage offen, ob Schwammsymbionten überhaupt aktiv ins umgebende Meerwasser entlassen werden (Zeitpunkt des „*spawning*“), oder passiert dies rein passiv vielleicht durch Verletzung und Zerstörung des Adult-Schwammes durch Räuber oder tropische Stürme? Sind die Symbionten außerhalb des Schwammes überhaupt metabolisch aktiv und vermehren sie sich auch im umgebenden Meerwasser? Können Schwammsymbionten, nachdem sie den Schwamm verlassen haben, ihn auch wieder erneut besiedeln? Zumindest auf die letzten beiden Fragen scheint es Antworten zu geben. So konnte unlängst gezeigt werden, dass die Schwamm-spezifischen Poribacteria, wenn sie denn im umgebenden Meerwasser gefunden werden, praktisch keine metabolische Aktivität aufweisen (Moitinho-Silva *et al.* 2013, in press). Außerdem konnten Fütterungsexperimente zeigen, dass Symbionten, die einmal aus einem Schwamm isoliert wurden, nicht wieder von einem Wirtschwamm aufgenommen werden können (Wehrl *et al.* 2007). Ob sich dies allerdings in natürlichen Umgebung ähnlich verhält, ist gerade auch hinsichtlich neuester Veröffentlichungen, die große Überschneidungen auf phylogenetischer Ebene zwischen den mikrobiellen Gemeinschaften in Meerwasser, LMA- und HMA-Schwämmen gefunden haben, unklar (Moitinho-Silva *et al.* 2013, in press).

Diskussion

In dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, inwieweit Mikroorganismen während dem Zeitpunkt des „*spawning*“ vom Adult-Schwamm in das umgebende Meerwasser entlassen werden. Während zum Zeitpunkt des „*spawning*“ und einen Tag später noch 6.0×10^9 Mikroorganismen pro Gramm Schwamm-Mesohyl vorhanden waren, konnten 12 Tage später nur noch $3,0 \times 10^9$ Mikroorganismen pro Gramm Schwamm-Mesohyl gezählt werden. Dies entspricht einem Verlust von fast 50 % der Mikroorganismen zwischen diesen beiden Zeitpunkten (Abb. 4.3). Ein Teil dieser Mikroorganismen wird sicherlich mit den Embryonen ausgeschieden, jedoch ist es auch vorstellbar, dass während dem „*spawning*“ selber ein nicht geringer Anteil an Mikroorganismen dem Schwamm-Mesohyl verloren geht. Angesichts dessen, dass je nach Reproduktionsaufwand Oozyten/Embryos bis zu 69,5 % des Gesamt-Schwammgewebes ausmachen können (Ereskovsky 2000, Sidri *et al.* 2005), erscheint dieses Szenario durchaus realistisch. Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen den ersten experimentellen Beweis für eine Reduzierung der Bakterienanzahl im Schwamm-Mesohyl während dem „*spawning*“ dar. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Schwamm-spezifische 16S rRNA Gene in Meerwasserproben, die in der nächster Umgebung des Schwammes *Rhopaloides odorabile* während dem „*spawning*“ genommen wurden, identifiziert werden konnten (Webster *et al.* 2010). Betrachtet man die Anzahl an Mikroorganismen von nicht-reproduktiven *E. ferox* Individuen ein Jahr später, so befinden sich diese auf dem post-„*spawning*“-Niveau des Vorjahrs. Wenn man annimmt, dass das post-„*spawning*“-Niveau die normale Menge darstellt, so müsste folgerichtig die Anzahl an Symbionten bis zum „*spawning*“ Zeitpunkt um bis zu 50% zunehmen. Ob dies ein vom Adult-Schwamm initiiertes Symbiontenwachstum oder ein Nebeneffekt, ausgelöst durch ein hohes Angebot an Nährstoffen (welches wiederum den Reproduktionszyklus des Schwammes beeinflussen kann), ist, bleibt unklar.

Die mittels 16S rRNA-Genbanken und der DGGE durchgeführten Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaft des adulten, embryonal und larvalen Gewebes von *E. ferox* ergab in den phylogenetischen Analysen insgesamt 21 „vertical transmission“ Cluster (nach der Definition von Schmitt *et al.* (2008)) innerhalb sechs verschiedener bakterieller Phyla. 19 von diesen VT-Clustern fielen dabei in „*sponge-specific*“ Cluster (SSC) bzw. „*sponge-coral*“ Cluster (SCC) (Abb. 4.4 a-e) (Hentschel *et al.* 2002), was zeigt, dass ein Großteil der mikrobiellen Gemeinschaft von *E. ferox* zum einen Schwamm-spezifisch ist und zum anderen ver-

Diskussion

tikal an die nächste Generation weitergegeben wird. Die in *E. ferox* und seinen reproduktiven Stadien identifizierten bakteriellen Phyla (Proteobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Spirochaetes, Nitrospira, Gemmatimonadetes) gehören zu den üblichen Vertretern die aus HMA Schwämmen isoliert werden (Taylor *et al.* 2007, Simister *et al.* 2012, Hentschel *et al.* 2012), genauso wie die „*sponge-associated unclassified lineage*“ (SAUL) (Schmitt *et al.* 2011a, Hentschel *et al.* 2012). Obwohl keine Phylotypen des fast ausschließlich aus Schwämmen isolierten Candidatus Phylum Poribacteria (Fieseler *et al.* 2004) in *E. ferox* identifiziert werden konnten, unterstützen diese Ergebnisse doch die Annahme, dass viele der in Schwämmen lebenden Bakterien obligate Symbionten sind.

Um die Frage zu klären, ob und in welchem reproduktiven Stadium von *E. ferox* diese bakteriellen Symbionten metabolisch aktiv sind, wurde ein Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaft auf Basis des 16S rRNA-Gens und deren Aktivität basierend auf der 16S rRNA durchgeführt (Abb. 4.6). Dieses Konzept wurde erfolgreich von Kamke *et al.* 2010 in die Schwamm-Mikrobiologie eingeführt, wobei die Autoren zeigen konnten, dass der Großteil der Schwammsymbionten *in situ* metabolisch aktiv zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit wurde das Konzept des Vergleichs der „Vorhandensein versus Aktivität“ („*presence versus activity*“) erstmals auch auf die DGGE übertragen, auch wenn die Methode hier nicht unumstritten ist.

Ein Problem der DGGE ist die Auflösung. Je höher der Gradient im Gel, desto geringer die Auflösung, was folglich bedeutet, dass sich mehrere 16S rRNA Gene mit demselben GC-Gehalt hinter einer Bande verbergen können. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist somit Vorsicht geboten. Zwar kann die Intensität einer Bande mitunter Rückschlüsse auf die Häufigkeit eines PCR-Produktes mit ähnlichem GC-Gehalt zulassen, aber damit nicht zwangsweise auf die Häufigkeit eines bestimmten 16S rRNA Gens in derselben oder in welchem Maße das dazugehörige Bakterium metabolisch aktiv ist. Sämtliche DGGE-Banden auszuschneiden und zu klonieren erschien bei bis zu 5 verschiedenen Klonen pro Bande (persönliche Beobachtung) hinsichtlich der formulierten Fragestellung wenig sinnvoll, weshalb nur ausgewählte Banden aus den 16S rDNA und 16S rRNA Linien kloniert wurden. Die anschließenden phylogenetischen Analysen der erhaltenen Sequenzen zeigte, dass die 16S rDNA häufig mit den entsprechenden 16S rRNA Sequenzen zusammen clustern (Abb. 4.4 a-e, Cyanobacteria, Bande Nr. 1 und 2; Chloroflexi, Bande Nr. 12 und 13; Acidobacteria, Bande Nr. 4 und 5),

Diskussion

was die Aussagekraft des DGGE-Gels bestätigt. Jedoch kam es auch vor, dass phylogenetisch nahe verwandte Sequenzen aus zwei völlig unterschiedlichen Banden isoliert wurden (Abb. 4.4e, Acidobacteria, Bande Nr. 4, 5 und 9). Dieser Versuch hatte aber nicht den Anspruch sämtliche Bakterien und deren Aktivität einzeln als Bande in der DGGE zu erfassen, sondern vielmehr ging es darum einen generellen Überblick über die Aktivität des mikrobiellen Konsortiums in den verschiedenen Reproduktions-Stadien von *E. ferox* zu erhalten. Somit erschien uns die DGGE trotz ihrer Nachteile als eine geeignete Methode, da sie einen brauchbaren ersten Eindruck von der Aktivität des mikrobiellen Konsortiums liefert. Mit wenigen Ausnahmen scheint das mikrobielle Konsortium von *E. ferox* in allen reproduktiven Stadien metabolisch aktiv zu sein. Die sich hinter den Banden Nr. 1 und 2 verbergenden Cyanobakterien sind wiederum nur im Adult-Schwammgewebe zu finden gewesen, wo sie auch metabolisch aktiv sind (Abb. 4.6). Dies sowie das Fehlen eines VT-Clusters bzw. eines SSC oder SCC im Phylum Cyanobacteria legt den Schluss nahe, dass diese Bakterien horizontal aufgenommen wurden (Abb. 4.4 a) und damit nur fakultative Schwammsymbionten darstellen. Allerdings bleiben hinsichtlich der horizontalen Aufnahme von Schwammsymbionten einige Fragen ungeklärt: Wie und wann treffen die beiden Symbiose-Partner das erste Mal zusammen? Das Pumpvolumen eines kaum stecknadelgroßen Juvenil-Schwammes dürfte sehr gering sein, womit die Frage bleibt, wie der Schwamm rein durch Filtration seine Symbionten aufnehmen will. Weiterhin ist bis heute ungeklärt, ob sich der Wirt die Symbionten aussucht oder umgekehrt? Ersteres hätte zur Folge, dass *E. ferox* das hier identifizierte Cyanobakterium aktiv in sein Pinacoderm/Mesohyl aufnehmen kann, was eine Art Immunsystem oder zumindest eine selektive Zell-Zell-Erkennung voraussetzen würde. Leider sind die Kenntnisse hinsichtlich des Immunsystems von Schwämmen noch sehr begrenzt (Müller *et al.* 1999, Müller und Müller 2003). Bei Letzterem müsste das Cyanobakterium das Schwammgewebe von *E. ferox* erkennen und sich vor dem Verdau durch Archaeozyten schützen, zum Beispiel indem es die an seiner Oberfläche erkennbaren Lipopolysaccharide (LPS) (Müller und Müller 2003) durch eine Mucusschicht maskiert.

All diese Fragen werden ohne ein symbiontenfreies Modellsystem von *E. ferox* schwer zu klären sein. Die Fortschritte in der Symbioseforschung der letzten Jahrzehnte gehen unter anderem auf das Vorhandensein von experimentell manipulierbaren Modellsystemen zurück, das sowohl ein symbiontenfreies Wirtssystem als auch kultivierbare Symbionten mit einschließt. Beispiele für die auf diesem Gebiet erzielten Fortschritte sind die Symbiose des Tin-

Diskussion

tenfisches *Euprymna scolopes* und des Bakteriums *Vibrio fischeri* (Nyholm *et al.* 2009), die Tier-Pflanzen-Symbiose zwischen *Hydra viridis* und der Alge *Chlorella* (Bosch 2012) oder der Pflanzen-Mikrobe-Symbiose zwischen *Sinorhizobium meliloti* und *Medicago truncatula* (Jones *et al.* 2007). Ein solches System existiert für die Schwamm-Mikroben-Symbiose bis heute noch nicht, wobei die Gründe dafür vielfältig sind. Zum einen ist es schwierig Schwammsymbionten zu kultivieren (Amann *et al.* 1995), zum anderen konnten symbiontenfreie Schwämme bisher nicht produziert werden (Friedrich *et al.* 2001). Hinsichtlich der experimentellen Bedeutung eines solchen Modellsystems wurde in dieser Arbeit ein neuer Ansatz erprobt, um symbiontenfreie Schwämme zu erzeugen. Hierfür wurden die Larven von *E. ferox* mit Antibiotika behandelt, womit die vorhandenen Symbionten beseitigt werden sollten, um am Ende symbiontenfreie Juvenil-Schwämme zu erhalten. Erwähnenswert ist hierbei, dass nach 4 Tagen Antibiotikabehandlung eine deutlich sichtbare Abnahme der Banden-Intensität mittels DGGE zu beobachten war (Abb. 4.7). Dies lässt darauf schließen, dass es in diesem frühen Entwicklungsstadium möglich ist die mikrobielle Gemeinschaft in Schwamm-Larven zu reduzieren. Ein negativer Effekt auf die larvale Entwicklung konnte innerhalb dieser 4 Tage bis hin zur Metamorphose zum Juvenil-Schwamm jedoch nicht beobachtet werden. Zukünftige Experimente, bei denen symbiontenhaltige und symbiontenfreie Juvenil-Schwämme wieder zurück ins Riff umgesetzt werden, sollten zeigen, welche Schwamm-Symbionten vertikal weitergegeben und welche horizontal aufgenommen werden. Solche Versuche im Feld ebnen den Weg zu einem tieferen Verständnis hinsichtlich der Interaktion von *E. ferox* mit mikrobiellen Symbionten.

5.2 Vergleich der mikrobiellen Diversität verschiedener *Oscarella*-Arten

Die Schwammgattung *Oscarella* gehört zu den erst kürzlich in den Stand einer Klasse erhobenen Homoscleromorpha-Schwämmen. Zur Zeit sind 16 verschiedene *Oscarella*-Arten in der „*world porifera database*“ (van Soest *et al.* 2013) aufgelistet, wovon allein sieben Arten im Mittelmeer zu finden sind. Die permanente Verfügbarkeit, einfache Handhabung und die daraus resultierenden zahlreichen Veröffentlichungen zu verschiedenen *Oscarella*-Arten hinsichtlich Morphologie, Fortpflanzung, Stoffwechsel, Genomik und ihrer Schwamm-assoziierten, mikrobiellen Gemeinschaften machen die Mitglieder dieser Gattung zu hervorragenden Studienobjekten, allen voran *Oscarella lobularis* als Modellschwamm (Ereskovsky *et al.* 2009). Die Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaft der verschiedenen *Oscarella*-Arten wurden bis jetzt zumeist mittels mikroskopischer Methoden durchgeführt. So besitzen die meisten *Oscarella*-Schwämme zwei bis drei verschiedene bakterielle Morphotypen, abgesehen von *Oscarella microlobata* mit fünf Morphotypen (Muricy *et al.* 1996, Ereskovsky 2006, Vishnyakov and Ereskovsky 2009, Perez *et al.* 2011, Muricy *et al.* 2004). Die in diesen Studien publizierten TEM Bilder zeigen keine dichten mikrobiellen Gemeinschaften im Schwamm-Mesohyl, wie sie typisch für HMA-Schwämme wie *Aplysina aerophoba* sind. Das Fehlen dieser wurde allerdings schon 1977 für *Oscarella lobularis* beschrieben (Vacelet und Donadey 1977). Eine erst kürzlich veröffentlichte molekulare Studie, in der die mikrobiellen Gemeinschaften verschiedenen mediterraner HMA- und LMA-Schwämmen (darunter auch *O. lobularis*) untersucht wurden, beschreiben deutliche Unterschiede im DGGE Banden Muster zwischen diesen beiden Gruppen (Gerce *et al.* 2011). So fehlen den LMA-Schwämmen die GC-reichen 16S rRNA Genfragmente, welche die bakteriellen Profile von HMA-Schwämmen dominieren (vgl. hierzu auch Kapitel 3.1). Vergleicht man nun die DGGE-Bandenprofile der hier untersuchten *Oscarella*-Arten mit denen, des als Vergleichsschwammes herangezogenen HMA-Schwammes *Aplysina aerophoba* (Abb. 4.8), so lassen sich die Ergebnisse von Gerce *et al.* (2011) eindeutig bestätigen (Gerce *et al.* 2011). All diese Ergebnisse sprechen für eine Einordnung der Gattung *Oscarella* in die Kategorie der LMA-Schwämme.

Während die bakteriellen Profile verschiedener Individuen einer Schwamm-Art relativ stabil zu sein scheinen (Schmitt *et al.* 2007b, Lee *et al.* 2009, Radwan *et al.* 2010, Webster *et al.* 2011, Gloeckner *et al.* 2012a, Gloeckner *et al.* 2012b), können sich die Profile innerhalb einer Gattung mitunter stärker unterscheiden (Erwin *et al.* 2012a). So besitzt das DGGE Profil von

Diskussion

O. tuberculata nur zwei Banden, welche wahrscheinlich die beiden mittels TEM charakterisierten bakteriellen Morphotypen darstellen (Vishnyakov und Ereskovsky 2009). Die restlichen *Oscarella*-Arten zeigen in der DGGE ca. sechs bis acht Banden und damit eine deutlich größere Diversität, als die zwei bis drei beschriebenen bakteriellen Morphotypen vermuten lassen (Vishnyakov und Ereskovsky 2009). Im DGGE Bild (Abb. 4.8) scheint nur eine Bande bei vier der fünf untersuchten *Oscarella*-Arten auf der gleichen Höhe zu liegen. Die aus diesen Banden gewonnenen Sequenzen waren allerdings höchst verschieden (Abb. 4.9 a-b), was weiterhin die Annahme bestätigt, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften der untersuchten mediterranen *Oscarella*-Arten deutlich voneinander unterscheiden. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Erwin *et al.* (2012) in ihrer Studie über artverwandte und sympatrisch im Mittelmeer vorkommenden *Ircinia*-Arten. Sie stellten fest, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften der HMA-Schwämme der Gattung *Ircinia* trotz weniger Gemeinsamkeiten auf OTU-Level deutlich voneinander unterscheiden. Die Autoren nehmen an, dass Standortfaktoren bzw. wirtsspezifische Faktoren, wie z. B. die evolutionäre Verwandtschaft eine entscheidende Rolle bei der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften spielen könnten (Erwin *et al.* 2012a).

Die Analyse der 16S rRNA-Genbank des Modellschwammes *Oscarella lobularis* zeigte eine nur geringe bakterielle Diversität auf Phylumebene. So konnten die aus *O. lobularis* extrahierten Sequenzen drei bakteriellen Phyla zugeordnet werden (Abb. 4.9 a-b), den Verruimicrobia, Bacteriodesetes und den Alpha- bzw. Gamma-Proteobacteria, wobei 76 % der Sequenzen zu letzterem Phylum gehören. Erwähnenswert ist außerdem, dass die meisten der hier erhaltenen Sequenzen eine größere Ähnlichkeit zu Meerwasser oder Sedimentsequenzen haben, als zu Sequenzen die aus anderen Schwämmen isoliert wurden. Folglich bilden sie auch keine SSC oder SCC, was bei HMA-Schwämmen der Fall wäre (Abb. 4.9 a-b). *O. lobularis* weist außerdem die für LMA-Schwämme typische Dominanz von Proteobakterien auf (Kamke *et al.* 2010, Schmitt *et al.* 2011b, Giles *et al.* 2013). Andere auch zu den Homoscleromorpha gehörende Schwammarten wie *Corticium* sp. und *Plakortis* sp., deren mikrobielle Gemeinschaften mit Hilfe von molekularen Methoden untersucht wurden, zeigen mit sieben bzw. acht Phyla eine hohe bakterielle Diversität. Des Weiteren wurden in diesen Schwämmen sogenannte HMA-Schwamm-Indikator-Phyla wie Chloroflexi oder Poribacteria gefunden (Sharp *et al.* 2007, Taylor *et al.* 2007). Somit belegen nicht nur die morphologischen, sondern auch die phylogenetischen Ergebnisse, dass *Oscarella lobularis* zu den LMA-Schwämmen zu zählen

Diskussion

ist. Damit ist die Gattung *Oscarella* in der Klasse der Homoscleromorpha die einzige innerhalb der LMA-Schwämme, während die anderen Gattungen, wie *Corticium* (Sharp *et al.* 2007), *Pseudocorticium* und *Plakina* (Schmitt *et al.* 2011a) auf Grund der hohen Anzahl an bakteriellen Phyla sowie dem Vorhandensein von HMA-Schwamm Indikator-Phyla zur Gruppe der HMA-Schwämme gezählt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass jede der hier untersuchten *Oscarella*-Arten eine artspezifische mikrobielle Gemeinschaft besitzt. Die Clusteranalyse in Abbildung 4.8 zeigt auf, dass die Bandenmuster der verschiedenen *Oscarella*-Arten untereinander nur eine sehr geringe Ähnlichkeit ($> 35\%$) zueinander besitzen, wogegen Individuen einer Art, mit Ausnahme von *O. balibalo*, Ähnlichkeiten von 80% und höher aufweisen. Im Fall von *O. lobularis* haben Individuen, die zur selben Zeit am selben Ort gesammelt wurden, auch sehr ähnliche DGGE-Profile (Abb. 4.8, 4.11 und 4.12). Dasselbe gilt für die hier untersuchten fünf verschiedenen Farbvariationen von *O. lobularis*, die nur geringfügige Unterschiede aufwiesen (Abb. 4.11). Auch scheint die Meerestiefe und der Standort keine große Auswirkung auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu haben (Abb. 4.12), was wiederum die Ergebnisse von Schöttner *et al.* (2013) unterstreicht, die herausfanden, dass Standortfaktoren nur einen sehr geringen Effekt ($<5\%$) auf die Zusammensetzung der mikrobielle Gemeinschaft von Schwämmen haben (Schöttner *et al.* 2013).

O. lobularis ist eine polymorphe Art, deren Individuen sich hinsichtlich der Farbe stark unterscheiden können (Abb. 4.10). Eine an zwei farblichen Variationen von *Ianthella basta* durchgeführte Studie konnte zeigen, dass sich diese in ihrem chemischen Profil unterschieden, was mit leichten Veränderungen in ihrer mikrobiellen Gemeinschaft einherging (Freckelton *et al.* 2012). Während die zahlenmäßig abundanten Alpha-Proteobacteria in den untersuchten Proben gleichermaßen vorlagen, fanden sich bei den seltener auftretenden bakteriellen Claden Unterschiede. Die Autoren vermuten daher, dass die Farbe der Schwämme entweder eine Folge der veränderten Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft ist, oder eben manche Bakterien das chemische Profil des Schwammes ändern, was direkte Auswirkungen auf dessen Farbe haben könnte. Ein wie für *I. basta* beschriebenes Szenario ist auch für die farblichen Variationen bei *O. lobularis* denkbar, jedoch war es nicht möglich solche Unterschiede in der „rare biosphere“ von *O. lobularis* mittels DGGE aufzuzeigen.

Diskussion

Insgesamt erscheint die mikrobielle Gemeinschaft von *O. lobularis* als artspezifisch, was indirekt die Ergebnisse von Giles *et al.* (2013) bestätigt, wonach manche LMA-Schwämme art-spezifische mikrobielle Gemeinschaften beherbergen, die sich deutlich von der des umgebenen Meerwassers unterscheiden (Giles *et al.* 2013). Weiterhin ist die Stabilität der mikrobiellen Gemeinschaft in *O. lobularis* wahrscheinlich eine Folge der über die Reproduktionsstadien weitergegebenen Mikroorganismen. Die vertikale Weitergabe von Symbionten konnte sowohl für *O. lobularis*, als auch für andere *Oscarella* Arten bewiesen werden (Ereskovsky und Boury Esnault 2002, Boury Esnault *et al.* 2003), wohingegen interessanterweise die reproduktiven Stadien von fünf karibischen LMA-Schwämmen als bakterienfrei beschrieben wurden (Schmitt *et al.* 2007a). Die Stabilität der mikrobiellen Gemeinschaft sowie die vertikale Weitergabe von Mikroorganismen in *O. lobularis* lassen auf ein evolutionär langes Zusammenleben und eine Symbiose mit mutualistischem oder wenigstens kommensalistischem Hintergrund schließen.

5.3 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Bakterienhaltigkeit von Schwämmen

Die korrekte Zuordnung der zu untersuchenden Schwämme in „*high microbial abundance*“ (HMA) bzw. „*low microbial abundance*“ (LMA) kann für den Versuchsaufbau, das Aufstellen einer Arbeitshypothese und die zu erwartenden Ergebnissen von entscheidender Wichtigkeit sein. Da jede Methode ihre Vor- und Nachteile birgt, sollen die hier verwendeten Methoden (DAPI-Färbung, DGGE und TEM) im Folgenden hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit bei der Einteilung der Schwämme in die beiden Gruppen besprochen werden.

Der Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) bindet an Thymin- bzw. Adenin-reiche Regionen doppelsträngiger DNA und wird sowohl für die Färbung lebender, als auch fixierter Zellen verwendet (Huber *et al.* 1985). Bei einer Emission von 461 nm (blau) färbt DAPI spezifisch nur DNA, worin einer der Vorteile dieses Farbstoffes liegt. Bei den hier gefärbten Schwammextrakten kam es aber immer wieder zu starkem Hintergrundrauschen durch nicht spezifische Färbungen. Über die Gründe lässt sich hier nur spekulieren. Es ist durchaus denkbar, dass der Farbstoff mit Sekundärstoffen des Schwammes reagiert und daher weniger spezifisch bindet. Auch kann es auf Grund der Konsistenz des Extraktes sein, dass sich der überschüssige Farbstoff nicht vollständig auswaschen ließ. Vor allem bei reproduktiv aktiven Schwämmen mit einem erhöhten Lipidanteil wurde dieses Phänomen beobachtet. Des Weiteren handelt es sich bei den im Extrakt angefärbten Bakterienzellen um eine Vielzahl verschiedener Morphotypen die trotz Fixierung mit unter den Farbstoff unterschiedlich aufnehmen, wodurch Intensitätsunterschiede in der Emission entstehen können. Ein weiteres Problem bei der Bakterienzählung ist das schnelle Ausbleichen des Farbstoffes und damit die Abnahme der Emissionsintensität unter UV-Licht. Trotz dessen, dass bei dem Gebrauch von DAPI als Farbstoff die Zellzahl sowie das Zellvolumen unterschätzt werden kann (Suzuki *et al.*), ist die DAPI-Färbung eine gute Methode um einen ersten Eindruck über die Bakterienhaltigkeit des untersuchten Schwammes zu bekommen.

Die denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) ist eine sogenannte „*fingerprinting*“ Technik, eigentlich entwickelt um Genveränderungen auf DNA Basis zu detektieren, jedoch wird sie auch zur Beschreibung bakterieller Gemeinschaften eingesetzt (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer und Smalla 1998). Neben der Information über die Zusammensetzung der mik-

Diskussion

robiellen Gesellschaft des Schwammes bekommt man auch einen ersten Eindruck über dessen Bakterienhaltigkeit. Allerdings ist die DGGE eine PCR-abhängige Methode mit allen Vor- und Nachteilen. So erfasst man je nach Wahl des Primerpaars nicht alle bakteriellen Phyla. Angesichts dessen, dass das Phylum Poribacteria in manchen HMA-Schwämmen hoch abundant ist (Schmitt *et al.* 2011a), aber nicht mit Standard 16S rRNA-Gen Primern für DGGE (341f+GC/907r (Muyzer *et al.* 1998)) vervielfältigt werden kann, stellt dies einen eindeutigen Nachteil dar. Außerdem beeinflusst die Wahl des Gelgradienten stark die Anzahl an sichtbaren Banden im Gel, die neben dem GC-Gehalt eines der Kriterien zur Einteilung des Schwammes in HMA oder LMA darstellt. Deshalb macht die DGGE als Methode nur im direkten Vergleich zu schon bekannten HMA- bzw. LMA-Schwammproben Sinn.

Mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden Schwämme schon 1981 in sogenannte „*bacteriosponges*“ bzw. „*non-symbiont containing sponges*“ oder „*normal sponges*“ eingeteilt (Reiswig 1981). Unter dem Mikroskop ist der Unterschied zwischen HMA- bzw. LMA-Schwämmen visuell am deutlichsten. Bei HMA-Schwämmen ist das Mesohyl dicht mit Bakterien besiedelt, während das Mesohyl von LMA-Schwämmen praktisch frei von Bakterienzellen ist. Wichtig hierbei ist es nicht schon bei der Probenentnahme Fehler zu begehen. So kann das Schwammgewebe, wenn es unsanft behandelt wird, „ausbluten“ und einen Großteil seiner Symbionten verlieren. Hierdurch sind weniger Symbionten im Mesohyl sichtbar, was wiederum eine fälschliche Einteilung in die Gruppe der LMA-Schwämme zu Folge haben kann. Ein Nachteil der TEM ist, dass nicht von den im Schwammgewebe sichtbaren morphologischen Phylotypen auf deren phylogenetische Identität geschlossen werden kann. Außerdem ist die Probenverarbeitung recht aufwendig, jedoch kann man auf die einmal gesicherten Proben jahrelang zurückgreifen. Unabhängig davon welche der hier beschriebenen Methoden zum Einsatz kommt, ist ein N=3 auf jeden Fall wünschenswert, um eine sichere Einteilung der untersuchten Schwämme zu gewährleisten. In der vorliegenden Studie wurde auf eine Wiederholung der Experimente zugunsten der unterschiedlichen Methoden verzichtet.

Die hier vorgestellten Ergebnissen zeigen, dass es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Schwamm-Arten hinsichtlich ihrer bakteriellen Abundanz gibt. So weisen die als HMA eingestuften Schwämme in der DGGE (Abb. 4.13) deutlich mehr Banden auf als die als LMA eingestuften, woraus man schließen kann, dass sie auch eine weitaus größere bakterielle

Diskussion

Diversität beherbergen. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, in denen die mikrobiellen Gemeinschaften von LMA- und HMA-Schwämmen beschrieben wurden (Weisz *et al.* 2007, Kamke *et al.* 2010, Schmitt *et al.* 2011a). So finden sich in HMA-Schwämmen unter anderem Chloroflexi und Poribacteria, die sogenannte HMA-Indikator Phyla darstellen (Sharp *et al.* 2007, Taylor *et al.* 2007) und die nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen in LMA-Schwämmen nachgewiesen werden konnten (Schmitt *et al.* 2011c, Giles *et al.* 2013). Vielmehr verhält es sich so, dass in HMA-Schwämmen bis zu acht und mehr bakterielle Phyla (32 Phyla mittels Pyrotaq-Sequenzierung (Schmitt *et al.* 2011a) zu finden sind (Kamke *et al.* 2010, Gloeckner *et al.* 2012b), während aus LMA-Schwämmen gerade einmal drei bis fünf bakterielle Phyla isoliert werden konnten (Gloeckner *et al.* 2012a, Giles *et al.* 2013). Auch im GC-Gehalt ihrer Symbionten unterscheiden sich HMA-Schwämme von LMA-Schwämmen. So ist der GC-Gehalt der HMA-Schwamm-Symbionten deutlich höher (Abb. 4.13) als der von LMA-Schwamm-Symbionten (Gerce *et al.* 2011). Auf Grund dieser Ergebnisse kann von einer direkten Korrelation zwischen mikrobieller Abundanz und mikrobieller Diversität ausgegangen werden.

Interessant hinsichtlich der Bakterienhaltigkeit der untersuchten Schwamm-Arten ist auch, dass innerhalb einer Gattung alle Schwämme entweder ausschließlich zu den HMA- oder LMA-Schwämmen gehören. So gehören die Schwammgattungen (mit einem Minimum von N=2) *Agelas*, *Ircinia* und *Aplysina* zu den HMA-Schwämmen, während die Gattung *Calyspongia* zu den LMA-Schwämmen gezählt werden kann. Dieser Umstand lässt sich auch auf Familien und Ordnungen ausweiten. So sind die Mitglieder folgender Ordnungen (Minimum N=2) HMA-Schwämme: Agelasida, Dictyoceratida und Verongida. Zu den Ordnungen Astrophoridae, Hadromerida, Poecilosclerida, Halichondrida und Haplosclerida gehören sowohl HMA- wie auch LMA-Schwämme. In der Dissertation von Markus Wehrl (2006) wurden eigenen Untersuchungen, sowie Ergebnisse aus der Literatur herangezogen, um die Bakterienhaltigkeit von Schwämmen mit ihrer Taxonomie zu korrelieren. Wehrl kam damals unter anderem zu folgenden Ergebnissen: Verongida und Agelasida gehören zu den HMA-Schwämmen, was den Ergebnissen dieser Studie entspricht. Die Ordnungen Astrophorida, Dictyoceratida, Hadromerida, Haplosclerida, Homosclerophorida enthalten sowohl HMA- wie auch LMA-Schwamm-Arten während die Ordnungen Poecilosclerida und Halichondrida ausschließlich LMA-Schwämme beinhalten. Das die beiden letztgenannten Ordnungen nur LMA-Schwämme beinhalten, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Vielmehr verhält

Diskussion

es sich so, dass die Ordnung Poecilosclerida den HMA-Schwamm *Ectyoplasia ferox* enthält, während der HMA-Schwamm *Myrmekioderma gyroderma* der Ordnung Halichondrida zugeordnet werden kann. Diese widersprüchlichen Ergebnisse machen es schwierig, ein Muster zu erkennen oder Vorhersagen zu treffen, ob ein Schwamm HMA oder LMA ist – jedoch ist die dieser Studie zugrunde liegende klassische Taxonomie nach Hopper und van Soest (2002) nicht ganz unumstritten. Gerade im Zeitalter der molekularen Marker wie dem 28S rRNA-Gen oder COI, mit denen Schwämme nicht mehr nur anhand ihrer morphologischen Merkmale, sondern auch anhand ihrer phylogenetischen Verwandtschaft klassifiziert werden können, werden die Rufe nach einer taxonomischen Neuordnung des Stammes Porifera laut (Borchielini *et al.* 2001). Die Aufwertung der Homoscleromorpha von einer Unterklasse der Demospongiae zu einer eigenständigen Klasse ist nur ein prominentes Beispiel der letzten Zeit (Gazave *et al.* 2010, 2012). So könnte bei zukünftigen taxonomischen Untersuchungen auf Gattungsebene neben den morphologischen und molekularen Merkmalen auch die Bakterienhaltigkeit bei der taxonomischen Einordnung von Schwämmen hilfreich sein. Zu beachten ist hier allerdings, dass HMA-Schwämme ihre Symbionten hypothetisch auch im Laufe der Evolution wieder verlieren bzw. LMA-Schwämme Symbionten aufnehmen könnten. Je größer also der Datensatz zu HMA- und LMA-Schwämmen ist, desto genauer kann man voraussichtlich einschätzen, ob es ein Muster bezüglich der Bakterienhaltigkeit innerhalb Gattungen, Familien und Ordnungen gibt – gerade die höheren taxonomischen Ebenen sind mitunter nur unzureichend beschrieben – oder ob es sich bei dem hier erkennbaren Muster um eine zufällige Ausnahme handelt.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnten die Erkenntnisse hinsichtlich der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft, der Art und Weise der Weitergabe und deren metabolischer Aktivität in verschiedenen marinen Schwämmen vertieft und erweitert werden. Für zukünftige Forschungsprojekte könnten folgende Projekte von Interesse sein:

- In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *E. ferox* einen Großteil seiner Symbionten vertikal an die nächste Schwammgeneration weitergibt. Auch gelang es zwei Cyanobakterien zu identifizieren, die wahrscheinlich horizontal aufgenommen werden. Eine 454-Pyrosequenzierungsstudie des Adult-Schwammes im Vergleich zu den korrespondierenden Larven und dem umgebenden Meerwasser könnte weitere horizontal aufgenommene Symbionten in der „rare biosphere“ identifizieren und somit zu einem tieferen Verständnis der vertikalen Weitergabe und horizontalen Aufnahme von Schwammsymbionten beitragen.
- Des Weiteren gelang es die Anzahl an Symbionten in *E. ferox* Larven durch Antibiotika-Behandlung zu verringern. Somit sollte es zukünftig möglich sein symbiontenfreie Juvenil-Schwämme über einen längeren Zeitraum hinweg experimentell zu erzeugen. Mithilfe dieses Symbionten-freien Wirtssystems könnte man in der natürlichen Umgebung des Riffs testen, welche Symbionten aus dem umgebenden Meerwasser horizontal aufgenommen werden.
- Von großem Interesse wäre auch eine Transkriptom-Analyse des Adult-Schwammes *E. ferox*, der korrespondierenden Larven und Juvenil-Schwämme, um zu erforschen welche Gene in welchen Stadien der Reproduktion aktiv sind. Diesen Ansatz kann man zusätzlich noch auf ausgewählte bakterielle Symbionten wie die Schwamm-spezifischen Poribacteria ausdehnen, um deren symbiontischen Einfluss während den verschiedenen Reproduktionsstadien einzuschätzen.

Ausblick

- Ein direkter Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften einzelner Larven untereinander und zum Adult-Schwamm mittels Pyrosequenzierung kann Aufschluss darüber geben, ob die vertikale Weitergabe von Schwammsymbionten über die Larven ein zielgerichtetes Ereignis ist (jede Larve trägt die gleichen Symbionten), oder ob die weitergegebenen Symbionten rein zufällig ausgewählt werden (jede Larve trägt unterschiedliche Symbionten).
- Außerdem konnten von den 23 hier untersuchten karibischen Schwämmen sechs anhand ihrer Bakterienhaltigkeit den HMA-Schwämmen und neun den LMA-Schwämmen zugeordnet werden. Da innerhalb einer Schwammgattung (z. B.: *Agelas*, *Callyspongia* und *Ircinia*) die Bakterienhaltigkeit konstant ist (HMA oder LMA) und sich dieses Phänomen teilweise auch auf die Familie erweitern lässt (*Aplysinidae*), könnte dies als ein weiteres Bestimmungsmerkmal in der Schwamntaxonomie verwendet werden. Gerade auf höheren taxonomischen Ebenen könnte das Merkmal der Bakterienhaltigkeit zu mehr Klarheit führen. Hierzu wäre es sinnvoll weitere Schwämme, auch aus anderen Meeresregionen, zu untersuchen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius, Temperatur
Abb.	Abbildung
AIX	Ampicillin-, IPTG- und X-Gal enthaltendes Nährmedium
ASW	synthetisches Seewasser
BLAST	„ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> “
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CMF-ASW	Calcium-/Magnesiumfreies, synthetisches Seewasser
DAPI	Diamino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
Dr.	Doktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
<i>et al.</i>	„ <i>et altera</i> “: und weitere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FA	Formaldehyd
g	Gramm, Masse
h	Stunde, Zeit
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HMA	„ <i>High-microbial-abundance sponge</i> “
„insert“	eingefügter DNA-Abschnitt
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
k. A.	keine Angaben

Anhang

kb	Kilobasen
LM	Licht Mikroskopie
LMA	„ <i>Low-microbial-abundance sponge</i> “
M	molar, 1 mol l^{-1}
m	Milli, 10^{-3}
m	Meter, Länge
min	Minute/n, Zeit
Mio.	Million, 10^6
MO	Mikroorganismen, Bakterien
μ	Mikro, 10^{-6}
n	Nano, 10^{-9}
n	Anzahl
NCBI	„ <i>National Center for Biotechnology Information</i> “
NOAA	„ <i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i> “
NURC	„ <i>National Undersea Research Center</i> “
OTU	„ <i>Operational Taxonomic Unit</i> “
%	Prozent
PCR	„ <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> “, Polymerasekettenreaktion
Pellet	Niederschlag, Sediment nach Zentrifugation
pH	pH-Wert
Prof.	Professor
r	Reverse
Ref.	Referenz
RFLP	Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	„ <i>Revolutions per minute</i> “, Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n, Zeit
SCUBA	„ <i>Self-Contained Underwater Breathing Apparatus</i> “
REM	Raster Elektronen Mikroskopie
SF	Standardfehler
sp.	„ <i>species</i> “: Biologie: Art
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Anhang

„template“	Matrizen-DNA
TEM	Transmissions-Elektronen Mikroskopie
T _m	„ <i>Melting temperature</i> “, Schmelztemperatur
U	„ <i>units</i> “, funktionelle Mengeneinheit bei Enzymen
UNC/CH	University of North Carolina at Chapel Hill
UNCW	University of North Carolina at Wilmington
unkult.	unkultiviert
USA	„ <i>United States of America</i> “, Vereinigte Staaten Amerikas
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt, elektrische Spannung
Vol.	Volumenteil
w/v	„ <i>Weight per volume</i> “
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galacto-pyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Anhang

7.2 Geräte, Materialien, Chemikalien

Tab. 7.2.1: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte	Firma	Artikelbezeichnung
96 „well“ Platte	Greiner	
Autoklaven	Systec GmbH	Systec VX-150
Brutschrank	VWR	Incu-Line
Destillieranlage für H ₂ O _{dd}	GFL	Bi-Dest 2304
Einmalküvetten	Plastibrand	halbmikro 1,5 ml
Eismaschine	Scotsman	AF-20
Filterapparaturen	Nalgene Sartorius	300-4050 516-7015
Fluoreszenz-Mikroskop Quecksilberdampfampe Objektive	Zeiss	Axiolab HBO 50 Plan-Apochromat 10x/ 0,30 Plan-Apochromat 20x/ 0,50 Plan-Apochromat 40x/ 0,75 Plan-Apochromat, Öl 40x/ 1,30 Plan-Apochromat, Öl 100x/
Fluoreszenz-Filterset Kamera-System	Intas	1,30 10, 15 MP Focus 5000
Gefrierschränke -20°C	Liebherr	Premium NoFrost
Gefrierschränke -80°C	Privileg Nunc Kendro	QBF 2185V36 Queue Basic QBF 2585V36
Geldokumentation	BioRad	Gel Doc 2000
Gelelektrophoresekammern	BioRad	Sub-Cell ^R GT
Glaskugeln		
Handvakuumpumpe	Nalgene	6133-0010
Heizblock	Rotibabo ^R -Block-Heater H250	Roth
Heizplatte mit Magnetrührer	WiseStir ^R	MS-20A

Anhang

Geräte	Firma	Artikelbezeichnung
Kühlschrank	Privileg	Superöko
Mikropipetten	Eppendorf Research	0,5-10 µl 2-20 µl 20-200 µl 100-1000 µl
Mikrowelle	Serverin	
Mörser	Hartenstein	MÖ10
Multipipette	Eppendorf	Multipipette ^R Plus
Netzgerät für Gelelektrophorese	BioRad	PowerPac TM Basic
Nitex-Gewebe	Hartenstein	Polyester, 100 µm
Nylonmembran	Whatman	Nytran SPC
Objektträger	Superior Marienfeld Knittel Gläser	Microslides mit 8-Feldern OTMM
PCR-Cycler	Biometra Biometra BioRad	T3 Thermocycler T3000 Termocycler C1000 Thermal Cycler
pH-Meter Elektrode	WTW	MultiLine P4 SenTix 41
Pipettenspitzen	Sarstedt	1000 µl blau 200 µl gelb 10 µl farblos
Pipettierhilfe	Brand	Accu-jet ^R Pro
Pistill	Hartenstein	PIS3
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss	DSM 962 scanning 130
Reaktionsgefäße	Sarstedt Thermo Scientific Greiner	1,5 ml; 2,0 ml 0,2 ml Thermo Stripes 15 ml, 50 ml Bio-one CELLSTAR [®]

Fortsetzung von Tabelle 7.2.1

Anhang

Geräte	Firma	Artikelbezeichnung
Schüttler	Edmund Bühler	TH 30
Spectrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 2000c
Sputter-Beschichter	Bal-Tec	SCD 005 Sputter Coater
Sterilbank	Nuaire	Biological Safty Cabinets Class II
Steriles Skalpell/Rasierklinge	-	-
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss	EM 10
Übernachtskulturröhrchen	-	-
Ultramikrotom	RMC, Tuscon, USA	OM U3
Universal Hood	BioRad	Universall Hood II Gel Doc 2000
Vortex	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Zentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Fresco 17 Centrifuge

Fortsetzung von Tabelle 7.2.1

Tab. 7.2.2: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton (C ₃ H ₆ O)	Roth
Agarose, ultrapur	Gibco
Ampicillin (Amp)	AppliChem
Borsäure (H ₃ BO ₃)	AppliChem
5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Cacodylat (C ₂ H ₆ AsNaO ₂ x 3H ₂ O)	AppliChem
Citifluor	Citifluor Ltd.
Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma
Eisessig (100 % Essigsäure)	Roth
Epon 812	Serva

Anhang

Bezeichnung	Hersteller
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	AppliChem
Ethanol absolut (EtOH)	Merck
Ethanol vergällt (EtOH)	Roth
1% Ethidumbromid-Lösung	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Na ₂ EDTA x 2H ₂ O)	Serva
para-Formaldehyd (PFA)	Serva
Formamid (HCONH ₂)	Roth
Formamid, HiDi	AppliedBiosystems
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O)	AppliChem
Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂)	Sigma
86% Glycerin (HOCH ₂ -CHOH-CH ₂ OH)	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Roth
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumbromid (KBr)	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	AppliChem
Methanol (CH ₄ O)	Roth
Natriumacetat Trihydrat (NaAc x 3H ₂ O)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Sigma
Propylenoxid (C ₃ H ₆ O)	Sigma

Fortsetzung von Tabelle 7.2.2

Anhang

Bezeichnung	Hersteller
Salzsäure (HCl)	AppliChem
Strontiumchlorid-Hexahydrat ($\text{SrCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Roth
Trypton/ Pepton aus Casein	Roth
Uranylacetat ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6\text{U}$)	Sigma

Fortsetzung von Tabelle 7.2.2

7.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 7.3: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Mengenangabe
90% Aceton	100% Aceton	450 ml
	H ₂ O _{dest}	50 ml
75% Aceton	100% Aceton	375 ml
	H ₂ O _{dest}	125 ml
50% Aceton	100% Aceton	250 ml
	H ₂ O _{dest}	250 ml
30% Aceton	100% Aceton	150 ml
	H ₂ O _{dest}	350 ml
10% Ampicillin Lösung	Ampicillin-Natrium-Salz	1.0 g
	H ₂ O (millipore)	ad 10.0 ml →steril-filtrieren
10% APS	Ammoniumpersulfat	0.1 g
	H ₂ O (millipore)	1 ml
Artifizielles Meerwasser (ASW)	NaCl	234.7 g
	Na ₂ SO ₄	39.2 g
	MgCl ₂ x 6H 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 (millipore)	ad 10 l
Cacodylat-Puffer (50mM; pH 7.4)	Na-Cacodylat (0.2 M; pH 7.2)	1.07 g (→pH 7.8 via HCl)
	25% Glutaraldehyd	10 ml
	ASW	ad 100 ml

Anhang

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Mengenangabe
DAPI-Lösung (100µg/ml)	4',6-Diamidin-2-phenylindol	100 µg
	H ₂ O (millipore)	1 ml
100% Denaturing solution at 10% Acrylamide	Acrylamid/Bisacrylamid	25 ml
	50x TAE	2 ml
	Formamid	40 ml
	Urea	42 g
	H ₂ O _{dest}	ad 100 ml
0% Denaturing solution at 10% Acrylamide	Acrylamid/Bisacrylamid	25 ml
	50xTAE	2 ml
	H ₂ O _{dest}	73 ml
100bp DNA ladder	100bp DNA ladder	0.2 ml
	Stop Puffer	0.2 ml
	H ₂ O (millipore)	0.8 ml
1kb DNA ladder	1kb DNA ladder	0.2 ml
	Stop Puffer	0.2 ml
	H ₂ O (millipore)	0.8 ml
dNTP mix	dATP	0.1 ml
	dCTP	0.1 ml
	dGTP	0.1 ml
	dTTP	0.1 ml
	10x PCR-Puffer	0.1 ml
	H ₂ O (millipore)	0.5 ml
90% Ethanol	100% Ethanol	450 ml
	H ₂ O _{dest}	50 ml
70% Ethanol	100% Ethanol	350 ml
	H ₂ O _{dest}	150 ml
50% Ethanol	100% Ethanol	250 ml
	H ₂ O _{dest}	250 ml
30% Ethanol	100% Ethanol	150 ml
	H ₂ O _{dest}	350 ml

Fortsetzung von Tabelle 7.3

Anhang

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Mengenangabe
Ethidiumbromid Färbebad	EtBr 10 mg/ml	0.1 ml
	H ₂ O _{dest}	200 ml
0.5M EDTA	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	136.1 g
	H ₂ O (millipore)	ad 1000 ml
		→pH 8 via NaOH (10N)
4% Formaldehyd	Formaldehyd (37%)	10.81 ml
	H ₂ O _{dest} (steril)	89.19 ml
2.5% Glutaraldehyd	25% Glutaraldehyd	10 ml
	ASW (steril)	90 ml
20% Glycerol	86% Glycerol	279 µl
	z. B. Flüssigkultur	921 µl
1M IPTG solution	IPTG	2.38 g
	H ₂ O (millipore)	ad 10.0 ml
		→steril-filtrieren
5M NaCl	NaCl	292.2 g
	H ₂ O (millipore)	ad 1000 ml
NaOH (10N)	NaOH	240 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
Phosphat buffered solution (10x PBS)	NaCl	40.0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	6.25 g
	KH ₂ PO ₄	1.0 g
	KCl	1.0 g
	H ₂ O (millipore)	ad 500 ml
		→pH 7.2-7.4 via HCl
1x PBS	10x PBS	10 ml
	H ₂ O _{dest}	90 ml
Plasmid mini präp Puffer 1	1M Tris/HCl, pH 7.5	5.0 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	2.0 ml
	RNase 10mg/ml	1.0 ml
	H ₂ O (millipore)	ad 100 ml

Fortsetzung von Tabelle 7.3

Anhang

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Mengenangabe
Plasmid mini präp Puffer 2	NaOH	0.8 g
	SDS	1.0 g
	H ₂ O (millipore)	ad 100 ml
Plasmid mini präp Puffer 3	NaAc x 3H ₂ O	40.8 g
	H ₂ O (millipore)	ad 100 ml
		→pH 4.8 via HCl
Propyleneoxid/Epon 812	Propylenoxid	50 ml
	Epon 812	50 ml
1% RNase A (10 mg/ml)	RNase A	10.0 mg
	H ₂ O (millipore)	1.0 ml
1% SDS	SDS	10 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
Sörensen-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7.4)	A) KH ₂ PO ₄	9.078 g ad 1000 ml H ₂ O _{dest}
	B) Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	11.876 g ad 1000 ml
	→81.8ml B+18.2ml A for pH 7.4	H ₂ O _{dest}
Stop-Puffer	Bromphenolblau	25.0 mg
	Xylencyanol	25.0 mg
	Ficoll Type 400	2.5 g
	H ₂ O (millipore)	ad 10 ml
50x TAE	Tris/HCl	242.0 g
	100% Essigsäure	57.1 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	100 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
1x TAE	50x TAE	20 ml
	H ₂ O _{dest}	980 ml
1M Tris/HCl	Tris/HCl	121.0 g
	H ₂ O (millipore)	ad 1000 ml
		→pH 7.5-8.0 via HCl
5% X-Gal solution	X-Gal	2.5 g
	Dimethylformamide	ad 50.0 ml

Fortsetzung von Tabelle 7.3

7.4 Enzyme und Reaktionskits

Tabelle 7.4: Verwendete Enzyme und Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
10x Dream Taq Green Buffer	Fermentas
ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
AllPrep DNA/RNA mini Kit	Qiagen
DNase	Promega
Enzym I, FastDigest HaeIII	Fermentas
Enzym II, FastDigest MspI	Fermentas
Fast DNA Spin Kit (for soil)	MP Biomedicals
GelGreen™	Biotium
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
NucleoSpin ExtractII Kits	Macherey-Nagel
pGEM T easy Vector System	Promega
Q-Solution/ Reaktionspuffer	Qiagen
RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNase A aus Rinderpankreas	Roche
SUPERase-In	Invitrogen

7.5 Medien

Tabelle 7.5: Verwendete Medien

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Luria-Bertani (LB) Medium	8.0 g Trypton/Pepton aus Casein 4.0 g Hefe Extrakt 4.0 g NaCl ad 800 ml H ₂ O _d
Luria-Bertani (LB) Medium + Ampicillin	800 ml LB medium 800 µl Ampicillin (100 µg/ml)
Luria-Bertani (LB) Agar	8.0 g Trypton/Pepton aus Casein 4.0 g Hefe Extrakt 4.0 g NaCl 12.0 g Agar ad 800 ml H ₂ O _d
LB Agar+Ampicillin+IPTG+X-gal (AIX)	800 ml LB Agar 800 µl Ampicillin (100 µg/ml) 400 µl IPTG 0.1M 1.28 ml X-Gal (50 mg/ml)

7.6 Mikroorganismen und Vektoren

- *Escherichia coli* Stamm Novablue (zum klonieren der PCR-Produkte mittels Hitze-schock) Genotype: endA1 hsdR17 (r_{K12}- m_{K12}+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA+B+lacI_qZDM15::Tn10] (Tetr)

- Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Cat.# A1360):

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten ist in Abb. 7.1 schematisch dargestellt.

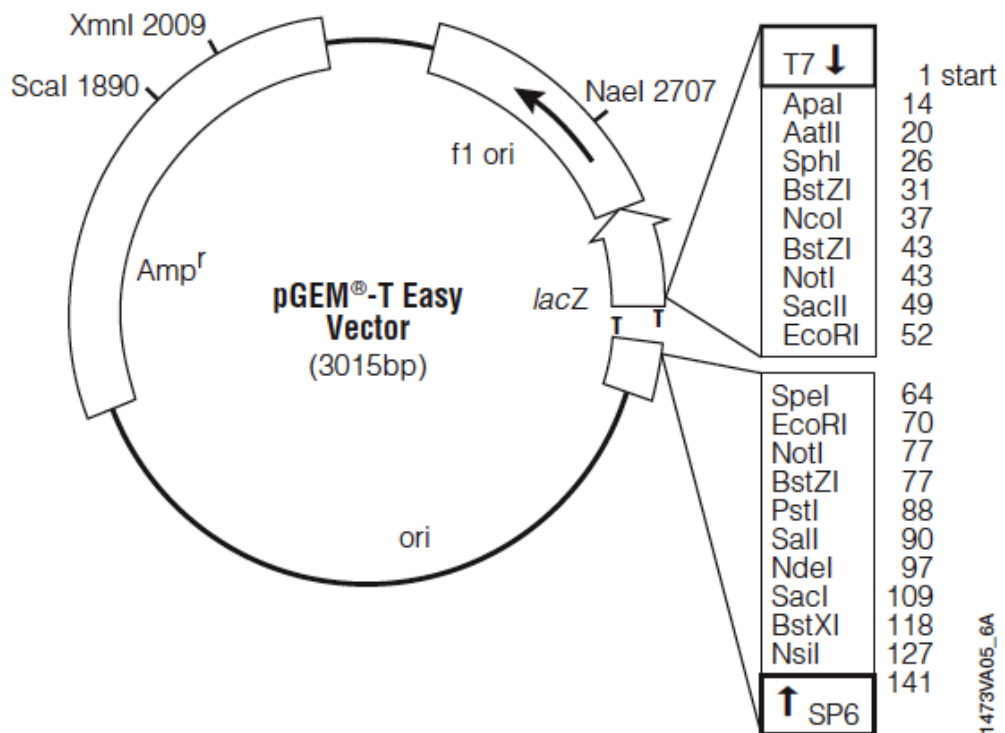
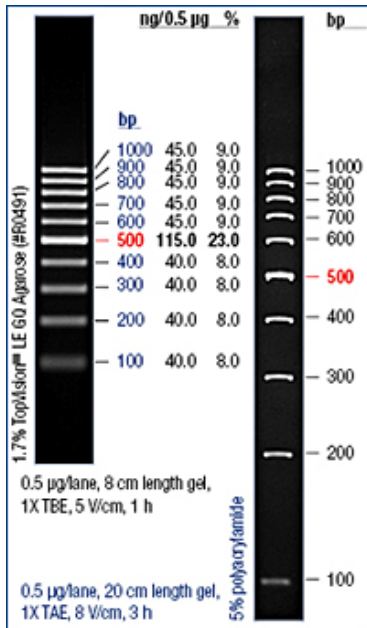


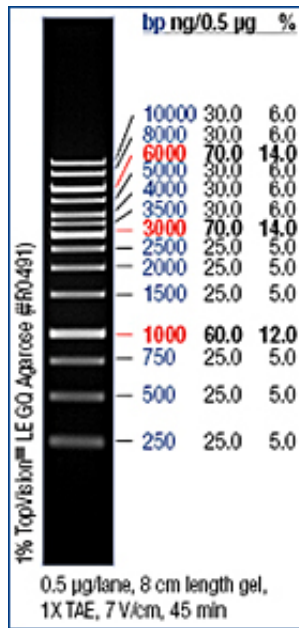
Abb. 7.1: Schematische Darstellung des verwendeten Klonierungsvektors pGEM[®]-T Easy (Promega).

7.7 Größenstandards

100bp DNA Ladder



1kb DNA Ladder



DGGE Markers I & II

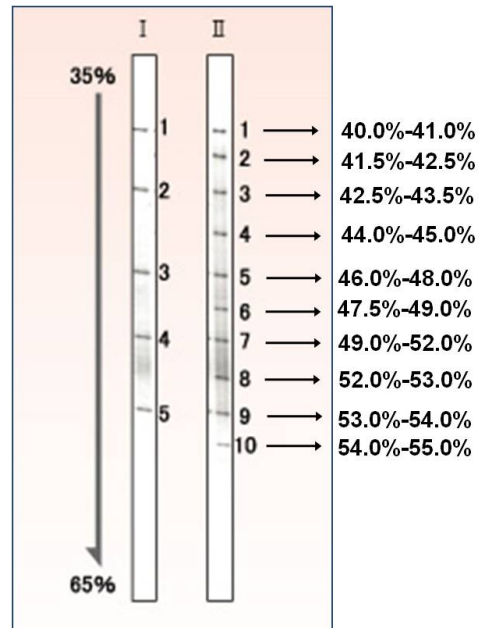


Abb. 7.2: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards. 100bp bzw. 1kb Marker (MBI-Fermentas Life Sciences), DGGE Marker I und II (WAKO)

Anhang

7.8 Oligonukleotide

Tabelle 7.8: Verwendete Oligonukleotide

Primer	5'-3' Sequenz	Annealing (°C)	Spezifität	Methode	Referenz
27f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA	56	Eubacterial 16S rDNA	PCR	(Lane <i>et al.</i> 1991)
1492r	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	57	Eubacterial 16S rDNA	PCR	(Lane <i>et al.</i> 1991)
341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	56	Eubacterial 16S rDNA	PCR, DGGE-PCR, Sequenzier-PCR	(Muyzer <i>et al.</i> 1998)
341f+GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG	57	Eubacterial 16S rDNA	DGGE-PCR	(Muyzer <i>et al.</i> 1998)
907r	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	52	Eubacterial 16S rDNA	PCR, DGGE-PCR	(Muyzer <i>et al.</i> 1998)
POR1130	GGCTCGTCACCAGCGGTC	63	Candidatus Phylum "Poribacteria"	PCR	(Fieseler <i>et al.</i> 2004)
POR389	CACGCGGCGTCGCATCGT	66	Candidatus Phylum "Poribacteria"	PCR	(Fieseler <i>et al.</i> 2004)
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	45	pGEM-T (Easy) vector	Colony-PCR, Sequenzier-PCR	Promega
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG	50	pGEM-T (Easy) vector	Colony-PCR, Sequenzier-PCR	Promega

Anhang

7.9 Programme

Tabelle 7.9: Verwendete Programme

Programm	Anwendung	Referenz
ARB	Konstruktion phylogenetischer Bäume basierend auf 16S rRNA Genen	(Ludwig <i>et al.</i> 2004)
AxioVision imaging Software	Dokumentation und Bearbeitung der Lichtmikroskopie-Aufnahmen	http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-software/axiovision-for-biology.html
Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)	Abgleich der Nucleotid-Sequenzen mit der NCBI Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ClustalX	Alignierung von 16S rRNA Sequenzen	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html
FigTree	Visualisierung des phylogenetischen Baumes	http://tree.bio.ed.ac.uk
Geneious Pro v5.6	Generierung von Vollsequenzen, Bearbeitung der Rohsequenzen	Biomatters, Ltd., Auckland, Neuseeland
GENTle	Bearbeitung der Rohsequenzdaten	Magnus Manske, Universität Köln
Microsoft Office 2010	Dokumentation, Präsentation und Auswertung von Daten	Microsoft Corporation
Mothur	Chimären-Check und weitere biostatistische Analysen	(Schloss <i>et al.</i> 2009)
Pintail 1.0	Chimären-Check	http://www.bioinformatics-toolkit.org/Pintail/index.html
SILVA	Datenbank für Alignment (SILVA Version 100, bzw. 106)	(Pruesse <i>et al.</i> 2007)
Sina webaligner	Automatisches Alignment	(Pruesse <i>et al.</i> 2012)
Quantity One 1-D analysis Software	Dokumentation von Gelbildern und Auswertung von DGGE-Gelbildern	Biorad, München
REM Software	Dokumentation von REM-Bildern	Soft imaging systems SIS based on analySIS Scandium
Vector NTI Advance TM 11	Generierung von Vollsequenzen (ContigExpress tool)	Invitrogen

7.10 Schwammproben

Tabelle 7.10.1: Verwendete schwammproben gesammelt am Conch Riff

Art	Tiefe (f)	Datum	Sammelstelle
<i>Ircinia felix</i>	50	21.05.09	Conch Reef
<i>Callyspongia vaginalis</i>	10	28.05.09	Triangle Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #5 Adult	50	10.09.09	Conch Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #6 Adult	50	10.09.09	Conch Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #8 Adult	50	10.09.09	Conch Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #5 Embryo	50	10.09.09	Conch Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #6 Embryo	50	10.09.09	Conch Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #8 Embryo	50	10.09.09	Conch Reef
<i>Ectyoplasia ferox</i> #5 Larve	0	12.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #6 Larve	0	12.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #8 Larve	0	12.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #5 Larve A ⁻	0	13.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #6 Larve A ⁻	0	13.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #8 Larve A ⁻	0	13.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #5 Larve A ⁺	0	17.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #6 Larve A ⁺	0	17.09.09	Labor
<i>Ectyoplasia ferox</i> #8 Larve A ⁺	0	17.09.09	Labor
<i>Xestospongia mute</i>	60	18.07.10	Conch Reef
<i>Smenospongia aurea</i>	10	19.07.10	Diadema

Anhang

Tabelle 7.10.2: Schwammproben gesammelt Bahamas

Art	Tiefe (f)	Datum	Sammelstelle
<i>Mycale laxissima</i>	50	04.07.10	Sweeting Key
<i>Verongula gigantea</i>	80	05.07.10	Sweeting Key
<i>Cribrochalina vasculum</i>	80	05.07.10	Sweeting Key
<i>Ircinia strobilina</i>	3	06.07.10	Sweeting Key
<i>Pseudoceratina crassa</i>	40	07.07.10	Little San Salvador
<i>Aplysina fistularis</i>	50	08.07.10	San Salvador
<i>Ulosa ruetzleri</i>	50	08.07.10	San Salvador
<i>Aplysina cauliformis</i>	70	09.07.10	San Salvador
<i>Agelas dispar</i>	70	09.07.10	San Salvador
Nicht identifizierter Schwamm	40	10.07.10	Southern Exuma
<i>Myrmekioderma gyroderma</i>	40	11.07.10	Nothern Exuma
<i>Erylus formosus</i>	40	12.07.10	Nothern Exuma
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	40	12.07.10	Nothern Exuma
<i>Ptilocaulis sp.</i>	50	13.07.10	Goulding Key
<i>Agelas archeri</i>	50	13.07.10	Goulding Key
Nicht identifizierter Schwamm	50	13.07.10	Goulding Key
<i>Agelas cathrodes</i>	50	13.07.10	Goulding Key
<i>Monochora arbuscula</i>	50	14.07.10	Bimini
<i>Batzella rubra</i>	50	14.07.10	Bimini
<i>Iotrochota birotulata</i>	50	14.07.10	Bimini
<i>Cinachyra alloclada</i>	50	14.07.10	Bimini
<i>Callyspongia plicifera</i>	50	15.07.10	Cat Key

Anhang

Tabelle 7.10.3: Schwammproben gesammelt im Mittelmeer

Art	Farbe	Tiefe (m)	Datum	Sammelstelle
<i>Oscarella tuberculata</i> #1	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella tuberculata</i> #3	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella balibaloï</i> #2	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella balibaloï</i> #3	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella microlobata</i> #1	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella microlobata</i> #2	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella viridis</i> #1	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella viridis</i> #2	k. A.	k. A.	08.07.11	Jarrei Höhle
<i>Oscarella lobularis</i> #1	k. A.	4m	08.07.11	Endoume Höhle
<i>Oscarella lobularis</i> #2	k. A.	4m	08.07.11	Endoume Höhle
<i>Oscarella lobularis</i> #1	rose	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #2	rose	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #1	violet	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #2	violet	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #1	grey	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #1	blue	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #1	pale blue	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #2	pale blue	8m	23.09.11	Maire Island
<i>Oscarella lobularis</i> #1	rosa	22m	26.09.11	Rio Sud
<i>Oscarella lobularis</i> #2	rosa	22m	26.09.11	Rio Sud
<i>Oscarella lobularis</i> #1	rosa	8m	04.10.11	J.Friule
<i>Oscarella lobularis</i> #1	rosa	23m	04.10.11	J.Friule
<i>Oscarella lobularis</i> #2	rosa	23m	04.10.11	J.Friule
<i>Aplysina aerophoba</i>			05.11	Limksi Kanal, Kroatien

8 Referenzen

- Abdelmohsen UR, Szesny M, Othman EM, Schirmeister T, Grond S, Stopper H, Hentschel U. 2012.** Antioxidant and anti-protease activities of diazepinomicin from the sponge-associated *Micromonospora* strain RV115. *Marine Drugs* **10**: 2208–2221.
- Abdul Wahab MA, De Nys R, Whalan S. 2011.** Larval behaviour and settlement cues of a brooding coral reef sponge. *Coral Reefs* **30**: 451–460.
- Allen JM, Reed DL, Perotti MA, Braig HR. 2007.** Evolutionary relationships of “*Candidatus Riesia* spp.,” endosymbiotic enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1659–1664.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143–169.
- Angermeier H. 2011.** Molekulare und ökologische Untersuchungen zu Krankheiten Karibischer Meeresschwämme. Dissertation, Universität Würzburg.
- Angermeier H, Kamke J, Abdelmohsen UR, Krohne G, Pawlik JR, Lindquist NL, Hentschel U. 2011.** The pathology of sponge orange band disease affecting the Caribbean barrel sponge *Xestospongia muta*. *FEMS Microbiology Ecology* **75**: 218–230.
- Angermeier H, Glöckner V, Pawlik JR, Lindquist NL, Hentschel U. 2012.** Sponge white patch disease affecting the Caribbean sponge *Amphimedon compressa*. *Diseases of Aquatic Organisms* **99**: 95–102.
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. 2005.** At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7724–7736.
- Baldacconi R, Nonnis-Marzano C, Gaino E, Corriero G. 2007.** Sexual reproduction, larval development and release in *Spongia officinalis* L. (Porifera, Demospongiae) from the Apulian coast. *Marine Biology* **152**: 969–979.
- Bandaranayake WM, Bemis JE, Bourne DJ. 1996.** Ultraviolet absorbing pigments from the marine sponge *Dysidea herbacea*: Isolation and structure of a new mycosporine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **115**: 281–286.
- Baumann P. 2005.** Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**: 155–189.

- Bayer K, Schmitt S, Hentschel U. 2007.** Microbial nitrification in Mediterranean sponges: possible involvement of ammonium-oxidizing Betaproteobacteria. *Porifera Research: biodiversity, innovation, sustainability. Série Livros. Museu Nacional, Rio de Janeiro*: 165–171.
- Bergquist PR. 1978.** *Sponges*. University of California Press.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. 2010.** Marine natural products. *Natural Product Reports* **27**: 165–237.
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y. 2001.** Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 171–179.
- Bosch TCG. 2012.** What hydra has to say about the role and origin of symbiotic interactions. *The Biological Bulletin* **223**: 78–84.
- Boury Esnault N, Ereskovsky A, Bezac C, Tokina D. 2003.** Larval development in the Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Invertebrate Biology* **122**: 187–202.
- Bright M, Bulgheresi S. 2010.** A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 218–230.
- Brusca R, Brusca G. 1990.** Phylum Porifera: the sponges. *Invertebrates. Sinauer Press, Sunderland, MA*: 181–210.
- Chanas B, Pawlik J. 1995.** Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. *Marine Ecology Progress Series* **127**: 195–211.
- Chelossi E, Milanese M, Milano A, Prontzato R, Riccardi G. 2004.** Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **309**: 21–33
- Collin R, Mobley A, Lopez L, Leys S, Diaz M, Thacker R. 2010.** Phototactic responses of larvae from the marine sponges *Neopetrosia proxima* and *Xestospongia bocatorensis* (Haplosclerida: Petrosiidae). *Invertebrate Biology* **129**: 121–128.
- Dale C, Moran NA. 2006.** Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell* **162**: 453–465.
- de Bary A. 1879.** Die Erscheinung der Symbiose. In *Tagebl Naturforschung. Versammlung Cassel, LI*.
- de Caralt S, Uriz MJ, Wijffels RH. 2007.** Vertical transmission and successive location of symbiotic bacteria during embryo development and larva formation in *Corticium candellabrum* (Porifera: Demospongiae). *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **87**: 1693–1699.
- Elvin DW. 1976.** Seasonal growth and reproduction of an intertidal sponge, *Haliclona permollis* (Bowerbank). *Biological Bulletin* **151**: 108–125.

- Enticknap J, Kelly M, Peraud O, Hill R. 2006.** Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3724–3732.
- Ereskovsky A. 2000.** Reproduction cycles and strategies of the cold-water sponges *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida), *Myxilla incrustans* and *Iophon piceus* (Demospongiae, Poecilosclerida) from the White Sea. *The Biological Bulletin* **198**: 77–87.
- Ereskovsky A. 2010.** *The Comparative Embryology of Sponges*. Springer.
- Ereskovsky A, Boury Esnault N. 2002.** Cleavage pattern in *Oscarella* species (Porifera, Demospongiae, Homoscleromorpha): transmission of maternal cells and symbiotic bacteria. *Journal of Natural History* **36**: 1761–1775.
- Ereskovsky A, Gonobobleva E, Vishnyakov A. 2005.** Morphological evidence for vertical transmission of symbiotic bacteria in the viviparous sponge *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarcida). *Marine Biology* **146**: 869–875.
- Ereskovsky AV. 2006.** A new species of *Oscarella* (Demospongiae : Plakinidae) from the Western Sea of Japan. *Zootaxa* **1376**: 37–51.
- Ereskovsky AV, Willenz P. 2008.** Larval development in *Guancha arnesenae* (Porifera, Calcispongiae, Calcinea). *Zoomorphology* **127**: 175–187.
- Ereskovsky AV, Borchiellini C, Gazave E, Ivanisevic J, Lapébie P, Perez T, Renard E, Vacelet J. 2009.** The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology: model sponge *Oscarella lobularis*. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **31**: 89–97.
- Erwin PM, López-Legendil S, González-Pech R, Turon X. 2012a.** A specific mix of generalists: bacterial symbionts in Mediterranean *Ircinia* spp. *FEMS Microbiology Ecology* **79**: 619–637.
- Erwin PM, López-Legendil S, Turon X. 2012b.** Ultrastructure, molecular phylogenetics, and chlorophyll a content of novel cyanobacterial symbionts in temperate sponges. *Microbial Ecology* **64**: 771–783.
- Ettinger-Epstein P, Whalan SW, Battershill CN, Nys R. 2007.** Temperature cues gametogenesis and larval release in a tropical sponge. *Marine Biology* **153**: 171–178.
- Fieseler L, Horn M, Wagner M, Hentschel U. 2004.** Discovery of the novel candidate phylum “Poribacteria” in marine sponges. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3724–3732.
- Freckelton ML, Luter HM, Andreakis N, Webster NS, Motti CA. 2012.** Qualitative variation in colour morphotypes of *Ianthella basta* (Porifera: Verongida). *Hydrobiologia* **687**: 191–203.
- Freeman CJ, Thacker RW. 2011.** Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. *Limnology and Oceanography* **56**: 1577–1586.

- Friedrich AB, Merkert H, Fendert T, Hacker J. 1999.** Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology*: 461–470.
- Friedrich AB, Fischer I, Proksch P, Hacker J, Hentschel U. 2001.** Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiology Ecology* **38**: 105–113.
- Fromont J, Berquist P. 1994.** Reproductive biology of three sponge species of the genus *Xestospongia* (Porifera: Demospongiae: Petrosida) from the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* **13**: 1–8.
- Gallissian M, Vacelet J. 1976.** Ultrastructure de quelques stades de l'ovogenèse de spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animale* **18**: 381–404.
- Gazave E, Lapébie P, Renard E, Vacelet J, Rocher C, Ereskovsky AV, Lavrov DV, Borchiellini C. 2010.** Molecular phylogeny restores the supra-generic subdivision of Homoscleromorph sponges (Porifera, Homoscleromorpha). *PLoS ONE* **5**: –.
- Gazave E, Lapébie P, Ereskovsky AV, Vacelet J, Renard E, Cardenas P, Borchiellini C. 2012.** No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia* **687**: 3–10.
- Gerce B, Schwartz T, Sylatak C, Hausmann R. 2011.** Differences between bacterial communities associated with the surface or tissue of Mediterranean sponge species. *Microbial Ecology* **61**: 769–782.
- Giles EC, Kamke J, Moitinho-Silva L, Taylor MW, Hentschel U, Ravasi T, Schmitt S. 2013.** Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology* **83**: 232–241.
- Gloeckner V, Hentschel U, Ereskovsky AV, Schmitt S. 2012a.** Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). *Marine Biology* **160**: 781–791.
- Gloeckner V, Lindquist N, Schmitt S, Hentschel U. 2012b.** *Ectyoplasia ferox*, an experimentally tractable model for vertical microbial transmission in marine sponges. *Microbial Ecology* **65**: 462–474.
- Goffredi S, Hurtado L, Hallam S, Vrijenhoek R.** Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomidae) of the “pacifica/lepta” species complex. *Marine Biology* **142**: 311–320.
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, Hacker J. 2001.** Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 305–312.
- Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, Moore BS. 2002.** Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4431–4440.

- Hentschel U, Fieseler L, Wehrl M, Gernert C, Steinert M, Hacker J, Horn M. 2003.** Microbial diversity of marine sponges. In *Sponges (Porifera)*. Springer Berlin Heidelberg. 59–88
- Hentschel Ute, Usher KM, Taylor MW. 2006.** Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology* **55**: 167–177.
- Hentschel Ute, Piel J, Degnan SM, Taylor MW. 2012.** Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 641–654.
- Hooper JN, Van Soest RW. 2002.** *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges*. Springer.
- Hoppe W. 1988.** Reproductive patterns in three species of large coral reef sponges. *Coral Reefs* **7**: 45–50.
- Hoppe W, Reichert M. 1987.** Predictable annual mass release of gametes by the coral reef sponge *Neofibularia nolitangere* (Porifera: Demospongiae). *Marine Biology* **94**: 277–285.
- Huber H, Huber G, Stetter KO. 1985.** A modified DAPI fluorescence staining procedure suitable für the visualization of lithotrophic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **6**: 105–106.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJ. 2001.** Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4399–4406.
- Hurtado LA, Mateos M, Lutz RA, Vrijenhoek RC. 2003.** Coupling of bacterial endosymbiont and host mitochondrial genomes in the hydrothermal vent clam *Calymene magnifica*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2058–2064.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007.** How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 619–633.
- Kamke J, Taylor MW, Schmitt S. 2010.** Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *The ISME Journal*: 1–11.
- Kaye HR. 1991.** Sexual reproduction in four Caribbean commercial sponges. II. Oogenesis and transfer of bacterial symbionts. *Invertebrate Reproduction & Development* **19**: 13–24.
- Lafi FF, Fuerst JA, Fieseler L, Engels C, Goh WWL, Hentschel U. 2009.** Widespread Distribution of Poribacteria in Demospongiae. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5695–5699.
- Lane DJ. 1991.** 16S/23S rRNA sequencing (Stackebrandt E and Goodfellow M, Eds.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*: 115–175.
- Lee OO, Qian PY. 2004.** Potential control of bacterial epibiosis on the surface of the sponge *Mycale adhaerens*. *Aquatic Microbial Ecology* **34(1)**: 11–21.

- Lee OO, Chui PY, Wong YH, Pawlik JR, Qian PY. 2009.** Evidence for vertical transmission of bacterial symbionts from adult to embryo in the Caribbean sponge *Svenzea zeai*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6147–6156.
- Lee OO, Wang Y, Yang J, Lafi FF, Al-Suwailem A, Qian PY. 2011.** Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *The ISME Journal* **5**: 650–664.
- Leong W, Pawlik JR. 2011.** Comparison of reproductive patterns among 7 Caribbean sponge species does not reveal a resource trade-off with chemical defenses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **401**: 80–84.
- Lepore E, Sciscioli M, Liaci LS, Santarelli G, Gaino E. 2000.** Sexual reproduction of *Cinachyra tarentina* (porifera, demospongiae). *Italian Journal of Zoology* **67**: 153–158.
- Leys SP, Yahel G, Reidenbach MA, Tunnicliffe V, Shavit U, Reiswig HM. 2011.** The sponge pump: the role of current induced flow in the design of the sponge body plan. *PLoS ONE* **6**: e27787.
- Lévi C, Porte A. 1962.** Étude au microscope électronique de l'éponge *Oscarella lobularis* Schmidt et de sa larve Amphiblastula. *Cahiers de Biologie Marine* **3**.
- Li CW, Chen JY, Hua TE. 1998.** Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**: 879–882.
- Love GD, Grosjean E, Stalvies C, Fike DA, Grotzinger JP, Bradley AS, Kelly AE, Bhatia M, Meredith W, Snape CE, Bowring SA, Condon DJ, Summons RE. 2009.** Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature* **457**: 718–721.
- Ludwig W, Schleifer K. 1994.** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS microbiology reviews* **15**: 155–173.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart A, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König 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, Schleifer K. 2004.** ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363–1371.
- Luter HM, Whalan S, Webster NS. 2010.** Exploring the role of microorganisms in the disease-like syndrome affecting the sponge *Ianthella basta*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5736–5744.
- Maldonado Manuel. 2007.** Intergenerational transmission of symbiotic bacteria in oviparous and viviparous demosponges, with emphasis on intracytoplasmically-compartmented bacterial types. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **87**: 1701–1713.
- Maldonado M, Riesgo A. 2008.** Reproduction in the phylum Porifera: a synoptic overview. *Treballs de la SCB* **59**: 29–49.

- Maldonado M, Riesgo A. 2009.** Gametogenesis, embryogenesis, and larval features of the oviparous sponge *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida, Demospongiae). *Marine Biology* **156**: 2181–2197.
- Maldonado Manuel, Sánchez-Tocino L, Navarro C. 2010.** Recurrent disease outbreaks in corneous demosponges of the genus *Ircinia*: epidemic incidence and defense mechanisms. *Marine Biology* **157**: 1577–1590.
- Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE. 2010.** The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**: 255–265.
- Moitinho-Silva L, Bayer K, Cannistraci CV, Giles EC, Ryu T, Seridi L, Ravasi T, Hentschel U. 2013.** Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. *Molecular Ecology*. in press.
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. 2008.** Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**: 165–190.
- Moya A, Peretó J, Gil R, Latorre A. 2008.** Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics* **9**: 218–229.
- Muricy G and Pearse J. 2004.** A new species of *Oscarella* (Demospongiae: Plakinidae) from California. *California Academy of Sciences*.
- Muricy G, BouryEsnault N, Bezac C, Vacelet J. 1996.** Cytological evidence for cryptic speciation in Mediterranean *Oscarella* species (Porifera, Homoscleromorpha). *Canadian Journal of Zoology* **74**: 881–896.
- Muyzer G, Smalla K. 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**: 127–141.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695–700.
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C. 1998.** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4. **3**: 1–27.
- Müller WE, Müller IM. 2003.** Origin of the metazoan immune system: identification of the molecules and their functions in sponges. *Integrative and Comparative Biology* **43**: 281–292.
- Müller WE, Koziol C, Müller IM, Wiens M. 1999.** Towards an understanding of the molecular basis of immune responses in sponges: The marine demosponge *Geodia cydonium* as a model. *Microscopy Research and Technique* **44**: 219–236.

Newman DJ, Cragg GM. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products* **67**: 1216-1238.

Nyholm SV, Stewart JJ, Ruby E G, McFall-Ngai M J. 2009. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environmental Microbiology* **11(2)**: 483-493.

Nyholm SV, McFall-Ngai MJ. 2004. The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 632–642.

Olson JB, Gochfeld DJ, Slattery M. 2006. Aplysina red band syndrome: a new threat to Caribbean sponges. *Diseases of Aquatic Organisms* **71**: 163–168.

Osinga R, Armstrong E, Grant Burgess J, Hoffmann F, Reitner J, Schumann-Kindel G. 2001. Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* **461**: 55–62.

Perez T, Ivanisevic J, Dubois M, Pedel L, Thomas OP, Tokina D, Ereskovsky AV. 2011. *Oscarella balibaloi*, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective* **32**: 174–187.

Pile AJ, Young CM. 2006. The natural diet of a hexactinellid sponge: Benthic–pelagic coupling in a deep-sea microbial food web. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **53**: 1148–1156.

Pimentel-Elardo SM, Scheuermayer M, Kozytska S, Hentschel U. 2009. *Streptomyces axinellae* sp. nov., isolated from the Mediterranean sponge *Axinella polypoides* (Porifera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 1433–1437.

Piscitelli M, Corriero G, Gaino E, Uriz MJ. 2011. Reproductive cycles of the sympatric excavating sponges *Cliona celata* and *Cliona viridis* in the Mediterranean Sea. *Invertebrate Biology* **130**: 1–10.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Gloeckner FO. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35**: 7188–7196.

Pruesse E, Peplies J, Gloeckner FO. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics (Oxford, England)* **28**: 1823–1829.

Radwan M, Hanora A, Zan J, Mohamed NM, Abo-Elmatty DM, Abou-El-Ela SH, Hill RT. 2010. Bacterial community analyses of two Red Sea sponges. *Marine Biotechnology* **12**: 350–360.

Reiswig HM. 1971. Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *The Biological Bulletin* **141**: 568–591.

Reiswig HM. 1974. Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **14**: 231–249.

Reiswig HM. 1981. Partial Carbon and Energy Budgets of the Bacteriosponge *Verongia fistularis* (Porifera: Demospongiae) in Barbados. *Marine Ecology* **2**: 273–293.

Ribes M, Coma R, Gili, JM. 1999. Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Marine Ecology Progress Series* **176**: 179-190.

Ridley CP, John Faulkner D, Haygood MG. 2005. Investigation of *Oscillatoria spongeliae*-dominated bacterial communities in four dictyoceratid sponges. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7366–7375.

Rottmann M, Schröder HC, Gramzow M, Renneisen K, Kurelec B, Dorn A, Friese U, Müller WE. 1987. Specific phosphorylation of proteins in pore complex-laminae from the sponge *Geodia cydonium* by the homologous aggregation factor and phorbol ester. Role of protein kinase C in the phosphorylation of DNA topoisomerase II. *The EMBO journal* **6**: 3939–3944.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*: 931–957.

Sarà M. 1971. Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae). *Marine Biology* **11**: 214-221

Schiller RD. 2006. Untersuchungen zur Bakterienhaltigkeit in karibischen Schwämmen und ausgewählten Reproduktionsstadien. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537–7541.

Schmidt EW, Obraztsova AY, Davidson SK, Faulkner DJ, Haygood MG. 2000. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, “Candidatus *Entotheonella palauensis*.” *Marine Biology* **136**: 969–977.

Schmitt S. 2007. Vertical microbial transmission in Caribbean bacteriosponges. Dissertation, Universität Würzburg

Schmitt S, Wehrl M, Lindquist N, Weisz JB, Hentschel U. 2007a. Morphological and molecular analyses of microorganisms in Caribbean reef adult sponges and in corresponding reproductive material. *Linfield College, Faculty Publications*: 561–568.

Schmitt S, Weisz JB, Lindquist N, Hentschel U. 2007b. Vertical transmission of a phylogenetically complex microbial consortium in the viviparous sponge *Ircinia felix*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2067–2078.

Schmitt S, Angermeier H, Schiller R, Lindquist N, Hentschel U. 2008. Molecular microbial diversity survey of sponge reproductive stages and mechanistic insights into vertical transmission of microbial symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 7694–7708.

Schmitt S, Tsai P, Bell J, Fromont Jane, Ilan M, Lindquist N, Perez T, Rodrigo A, Schupp PJ, Vacelet Jean, Webster N, Hentschel U, Taylor MW. 2011a. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal* **6**: 564–576.

Schmitt S, Hentschel U, Taylor MW. 2011b. Deep sequencing reveals diversity and community structure of complex microbiota in five Mediterranean sponges. *Hydrobiologia* **687**: 341–351.

Schmitt S, Deines P, Behnam F, Wagner M, Taylor MW. 2011c. Chloroflexi bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology* **78**: 497–510.

Schöttner S, Hoffmann F, Cardenas P, Rapp HT, Boetius A, Ramette A. 2013. Relationships between host phylogeny, host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges. *PLoS ONE* **8**: e55505.

Schramm A, Davidson SK, Dodsworth JA, Drake HL, Stahl DA, Dubilier N. 2003. Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environmental Microbiology* **5**: 804–809.

Sharp KH, Eam B, Faulkner DJ, Haygood MG. 2007. Vertical transmission of diverse microbes in the Tropical sponge *Corticium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 622–629.

Shick JM, Dunlap WC. 2002. Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Physiology* **64**: 223–262.

Sidri M, Milanese M, Bümmer F. 2005. First observations on egg release in the oviparous sponge *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Chondrosida, Chondrillidae) in the Mediterranean Sea. *Invertebrate Biology* **124**: 91–97.

Simister RL, Deines P, Botté ES, Webster NS, Taylor MW. 2012. Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environmental Microbiology* **14**: 517–524.

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12115–12120.

Stackebrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**: 152.

- Steger D, Ettinger-Epstein P, Whalan S, Hentschel U, de Nys R, Wagner M, Taylor MW. 2008.** Diversity and mode of transmission of ammonia-oxidizing archaea in marine sponges. *Environmental Microbiology* **10**: 1087–1094.
- Suzuki, MT, Sherr E, Sherr BF. 1993.** DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting. *Limnology and Oceanography* **38**: 1566-1570.
- Tabares P, Degel B, Schaschke N, Hentschel U, Schirmeister T. 2012.** Identification of the protease inhibitor miraziridine A in the Red sea sponge *Theonella swinhoei*. *Pharmacognosy research* **4**: 63–66.
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007.** Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**: 295–347.
- Taylor MW, Tsai P, Simister RL, Deines P, Botte E, Ericson G, Schmitt S, Webster NS. 2013.** “Sponge-specific” bacteria are widespread (but rare) in diverse marine environments. *The ISME Journal* **7**: 438–443.
- Unson MD, Holland ND, Faulkner DJ. 1994.** A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology* **119**: 1–11.
- Usher KM, Kuo J, Fromont J, Sutton D. 2001.** Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* **461**: 15–23.
- Usher KM, Sutton DC, Toze S, Kuo J, Fromont J. 2005.** Inter-generational transmission of microbial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Marine and Freshwater Research* **56**: 125.
- Vacelet J. 1970.** Description de cellules a bactéries intranucléaires chez des éponges Verongia. *Journal of Microscopy* **9**: 333–346.
- Vacelet J. 1971.** Étude en microscopie électronique de l’association entre une cyanophycéeChroococcale et une éponge du genre Verongia. *Journal of Microscopy* **12**: 363-380.
- Vacelet J. 1975.** Etude en microscopie electronique de l’association entre bacteries et spongiaires du genre Verongia (Dictyoceratide). *Journal de microscopie et de biologie cellulaire* **23**: 271–288.
- Vacelet J, Donadey C. 1977.** Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **30**: 301-314.
- Van Soest, RWM, Boury-Esnault N, Hooper JNA, Rützler K, de Voogd NJ, Alvarez de Glasby B, Hajdu E, Pisera AB, Manconi R, Schoenberg C, Janussen D, Tabachnick KR, Klautau M, Picton B, Kelly M, Vacelet J, Dohrmann M, Cristina Díaz M. 2013** World Porifera database. Accessed at <http://www.marinespecies.org/porifera> on 2013-01-02

- Van Soest RWM, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, De Voogd NJ, Santodomingo N, Vanhoorne B, Kelly M, Hooper JNA. 2012.** Global diversity of sponges (porifera). *PLoS ONE* **7**: e35105.
- Vishnyakov AE, Ereskovsky AV. 2009.** Bacterial symbionts as an additional cytological marker for identification of sponges without a skeleton. *Marine Biology* **156**: 1625–1632.
- Vogel S. 1977.** Current-induced flow through living sponges in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 2069–2071.
- Webster NS, Negri AP, Webb RI, Hill RT. 2002.** A spongin-boring alpha-proteobacterium is the etiological agent of disease in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Marine Ecology Progress Series* **232**: 305–309.
- Webster NS, Taylor MW, Behnam F, Lückner S, Rattei T, Whalan S, Horn M, Wagner M. 2010.** Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environmental Microbiology* **12**: 2070–2082.
- Webster NS, Cobb R, Soo R, Anthony S, Battershill C, Whalan S, Evans-Illidge E. 2011.** Bacterial community dynamics in the marine sponge *Rhopaloeides odorabile* under in situ and ex situ cultivation. *Marine Biotechnology* **13**: 296–304.
- Wehrl M. (2006)** Bakterielle Aufnahme, Selektivität und interne Prozessierung bei marinen Schwämmen (Porifera) Dissertation, Universität Würzburg.
- Wehrl M, Steinert M, Hentschel U. 2007.** Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbial Ecology* **53**: 355–365.
- Weisz JB, Lindquist N, Martens CS. 2007.** Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? *Oecologia* **155**: 367–376.
- Wijffels RH. 2008.** Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology* **26**: 26-31.
- Wilkinson CCR. 1978a.** Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology* **49**: 161–167.
- Wilkinson CCR. 1978b.** Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Marine Biology* **49**: 169–176.
- Wilkinson CCR. 1978c.** Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Marine Biology* **49**: 177–185.
- Wilkinson CCR, Garrone RR. 1980.** Nutrition of marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. *Nutrition in the lower Metazoa*: 157–161.
- Wilkinson CCR, Cheshire AA, Klumpp DD, McKinnon DA. 1988.** Nutritional spectrum of animals with photosynthetic symbionts—corals and sponges. *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium* **3**: 27-30.

9 Publikationen und Tagungsbeiträge

9.1 Publikationen

Angermeier H, Gloeckner V, Pawlik JR, Lindquist NL, Hentschel U. 2012. Sponge white patch disease affecting the Caribbean sponge *Amphimedon compressa*. *Diseases of Aquatic Organisms* **99**: 95–102.

Gloeckner V, Hentschel U, Ereskovsky AV, Schmitt S. 2012a. Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). *Marine Biology* **160**: 781–791.

Gloeckner V, Lindquist N, Schmitt S, Hentschel U. 2012b. *Ectyoplasia ferox*, an experimentally tractable model for vertical microbial transmission in marine sponges. *Microbial Ecology* **65**: 462–474.

Ngwa CJ, Gloeckner V, Abdelmohsen UR, Scheuermayer M, Fischer R, Hentschel U, Pradel G. 2013. 16S rRNA gene-based identification of *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae) as a dominant midgut bacterium of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) with antimicrobial activities. *Journal of Medical Entomology* **50**: 404–414.

9.2 Tagungsbeiträge

Glöckner Volker, Schmitt Susanne, Lindquist Niels, Hentschel Ute (2012). Amount, activity and mode of transmission of microbial symbionts associated with the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox* **Oral Presentation**. Annual Meeting der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen, Germany

Glöckner Volker, Schmitt Susanne, Lindquist Niels, Hentschel Ute (2012). Amount, activity and mode of transmission of microbial symbionts associated with the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox* **Poster**. Internationaler Workshop “Lower invertebrates symbiosis with microorganisms” Tel-Aviv/Eilat, Israel.

Glöckner Volker, Schmitt Susanne, Lindquist Niels, Hentschel Ute (2011). Ecological and functional aspects of vertical transmission of microorganisms in the model sponge *Ectyoplasia ferox* **Poster**. Microbial Interactions in Marine Systems (MIMAS), Greifswald, Germany.

Glöckner Volker, Schmitt Susanne, Lindquist Niels, Hentschel Ute (2011). Ecological and functional aspects of vertical transmission of microorganisms in the model sponge *Ectyoplasia ferox* **Poster**. 1st International Symposium on Sponge Microbiology (ISSM), Würzburg, Germany.

10 Feldarbeit und Forschungsaufenthalte

- 12/2011 **Feldarbeit am Red Sea Research Center** der King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Yeddah, Königreich von Saudi Arabien, unter der Leitung Prof. Timothy Ravasi.
- 7/2010 **Forschungsexpedition auf Bahamas** an Bord der RV Walton Smith und RV Cape Hatteras unter der Leitung von Prof. Joseph Pawlik (UNCW/USA).
- 7 - 8/2010 Feldarbeit am **National Undersea Research Center (NURC)** der University of North Carolina at Wilmington (UNCW) in Key Largo, Florida, unter der Leitung von Prof. Niels Lindquist (IMS/ UNC-CH/USA) und Prof. Chris Martens (UNC-CH/USA).
- 8 - 9/2009 Feldarbeit am **National Undersea Research Center (NURC)** der University of North Carolina at Wilmington (UNCW) in Key Largo, Florida, unter der Leitung von Prof. Niels Lindquist (IMS/ UNC-CH/USA) und Prof. Chris Martens (UNC-CH/USA).
- 5 - 6/2009 Feldarbeit am **National Undersea Research Center (NURC)** der University of North Carolina at Wilmington (UNCW) in Key Largo, Florida, unter der Leitung von Prof. Niels Lindquist (IMS/ UNC-CH/USA) und Prof. Chris Martens (UNC-CH/USA).

11 Fortbildungen und Workshops

11.1 In Zusammenhang mit Lehre

09/2011 Gezieltes Atmen - fester Stimmeinsatz - überzeugende Artikulation. Service-Zentrum innovatives Lehren und Studieren (ZiLS) Universität Würzburg

04/2011 Rhetorik - frei und überzeugend sprechen. Service-Zentrum innovatives Lehren und Studieren (ZiLS) Universität Würzburg

12/2010 Didaktik - Professionell präsentieren und visualisieren. Service-Zentrum innovatives Lehren und Studieren (ZiLS) Universität Würzburg

11.2 In Zusammenhang mit der Feldarbeit

9/2009 **Nitrox class** am **National Undersea Research Center** (NURC) of the University of North Carolina at Wilmington (UNCW) in Key Largo, Florida, under supervision of Otto Rutten (Associate Director).

5/2009 **Scientific diver in training class** unter der Leitung von Glenn Safrit (DSO) am Institute of Marine Sciences in Morehead-City NC, USA.

12 Lebenslauf

Hochschulstudium

- 03/2008 Abschluss des Studiums zum Diplom-Biologen an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- 06/2007 - 03/2008 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Tierphysiologie/Zoologie II Sozialrufe bei Blütenfledermäusen: Beschreibung und Vergleich der Lautrepertoires von *Glossophaga soricina* und *Glossophaga commissarisi*.
- 04/2007 Diplomprüfung in den Fächern: Tierphysiologie (Hauptfach), Immunologie, Zoologie und Botanik (Wahlfächer)
- 10/2001 - 03/2008 Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- 10/2000 - 07/2001 Jurastudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Zivildienst

- 07/1999 - 06/2000 BRK-Kreisverband Lichtenfels

Anhang

Schulbildung

09/1993 - 06/1999	Dientzenhofer-Gymnasiums Bamberg, Abschluss mit Abitur
09/1989 - 06/1993	Meranier-Gymnasiums Lichtenfels
09/1985 - 07/1989	Adam-Riese-Grundschule Bad Staffelstein
24.02.1979	Geboren in Lichtenfels