

Prokaryoten und mikrobielle Eukaryoten aus marinen Schwämmen

Ökologische, mikromorphologische und molekularbiologische
Untersuchungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stefan Steffens

aus Düren

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Norbert Wilbert
2. Referent: Prof. Dr. Dr. Hans G. Trüper

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Biologie von Schwämmen.....	2
1.2 Symbiosen von Schwämmen.....	5
1.2.1 Bakterielle Symbionten in Schwämmen	6
1.2.2 Pilzliche Symbionten in Schwämmen	9
1.3 Fragestellung.....	11
2 Untersuchungsgebiete und Probennahme	12
2.1 Untersuchungsgebiete.....	12
2.2 Probennahme	12
2.3 Aufarbeitung der Schwammproben	14
2.4 Hälterungsansatz.....	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Morphologische Untersuchung der Schwämme	16
3.1.1 Lichtmikroskopie.....	16
3.1.1.1 Vibratomschnitte.....	16
3.1.1.2 Histologische Färbungen	17
3.1.1.3 Kollagenase-Nachweis	18
3.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie	19
3.1.3 Rasterelektronenmikroskopie.....	20
3.2 Mikrobiologische Untersuchungen.....	20
3.2.1 Pilzisolierung und Kultivierung.....	20
3.2.2 Pilzkultivierung für naturstoffchemische Untersuchungen.....	22
3.2.3 Bakterienisolierung und Kultivierung	22
3.3 Molekularbiologische Methoden	23
3.3.1 DNA-Extraktion.....	23
3.3.1.1 DNA Extraktion aus Schwammproben.....	23
3.3.1.2 DNA Extraktion aus Bakterienreinkulturen.....	25
3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	27
3.3.4 Verdau der bakteriellen 16S rRNA zum Artenvergleich der Schwamm-Isolate.....	27
3.3.5 Klonierung der bakteriellen 16S rRNA PCR-Produkte.....	28
3.3.6 Einzelstrang Konformationspolymorphismus (SSCP)	29
3.3.7 Reamplifikation von SSCP-Banden.....	31
3.3.8 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE).....	32
3.3.9 Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH).....	33
3.3.10 Sondengenerierung für FISH	36
3.3.11 Sequenzanalyse.....	37
3.3.12 Stammbaumberechnung.....	38

4 Ergebnisse	39
4.1 Vergleichende histologische Untersuchungen zu mikrobiellen Endo- und Epibionten verschiedener Schwammarten	39
4.1.1 Besiedlung der Schwammoberfläche	39
4.1.2 Besiedlung des Schwammgewebes	40
4.2 Bakterielle Endobionten in <i>Axinella verrucosa</i>	48
4.2.1 Fadenförmige Mikroorganismen im Spongium	49
4.2.2 Bakterien in intrazellulären Vakuolen	53
4.2.3 Kollagenaseaktivität	54
4.2.4 Hälterungsexperiment	55
4.3 Kultivierte bakterielle Diversität in <i>Axinella verrucosa</i>	57
4.4 Genetische Diversität der Bakterien in <i>Axinella verrucosa</i>	59
4.4.1 Klonierte bakterielle Diversität in <i>Axinella verrucosa</i>	59
4.4.2 Vergleich der Bakterienpopulationen von <i>Axinella verrucosa</i> und Vergleichsschwämmen mit SSCP und DGGE	65
4.5 Bestimmung der Bakterien in <i>Axinella verrucosa</i> durch Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH)	71
4.5.1 Untersuchungen mit domäne- und gruppenspezifischen Sonden	71
4.5.2 Generierung von spezifischen Sonden für <i>Axinella verrucosa</i> Bakterien	73
4.6 Isolierbare pilzliche Diversität ausgewählter mediterraner Schwämme	77
4.6.1 Hyphenpilze	77
4.6.2 Pilzähnliche Protisten	78
4.6.3 Neue Sekundärmetabolite aus schwammisolierten Pilzen	79
5 Diskussion	81
5.1 Mikrobielle Epi- und Endobionten verschiedener Schwammspezies	81
5.1.1 Mikrobielle Besiedlung der Schwammoberfläche	81
5.1.2 Mikrobielle Besiedlung des Schwammgewebes	82
5.2 Bakterielle Endobionten von <i>Axinella verrucosa</i>	86
5.2.1 Bakterien des Mesohyls	86
5.2.2 Filamentöses α -Proteobakterium im Sponginskelett	87
5.2.3 Bakterien in Vakuolen der Schwammzellen	93
5.2.4 Kultivierte bakterielle Diversität	94
5.2.5 Klonierte bakterielle Diversität	96
5.3 Pilze aus den Schwammproben	101
5.3.1 Isolierte Hyphenpilze aus den untersuchten Schwämmen	101
5.3.2 Isolierte pilzähnliche Protisten aus den untersuchten Schwämmen	105
5.4 Schlussbetrachtung	106
6 Zusammenfassung	108
7 Literaturverzeichnis	109
8 Abkürzungen	132
9 Anhang	134

1 Einleitung

Mikrobielle Endobionten von Schwämmen haben in den letzten Jahren besonders durch verschiedene Naturstoffprojekte an Bedeutung gewonnen (Jayatilake et al. 1996, Faulkner et al. 2000, Jensen und Fenical 2000, Schmidt et al. 2000). Schwämme haben sich als Produzenten von besonders vielen biologisch aktiven Substanzen erwiesen, da sie durch ihre sessile Lebensweise auf chemische Abwehr und Kommunikation angewiesen sind (Becerro et al. 1997, Faulkner et al. 1999, Assmann et al. 2000, Burns et al. 2003). Bei der Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen aus marinen Schwämmen fanden verschiedene Arbeitsgruppen, dass der Ursprung mancher Verbindung nicht der Schwamm selber, sondern vergesellschaftete Mikroorganismen sind (Stierle et al. 1988, Unson et al. 1994, Bewley et al. 1996). Da die Ressource Schwamm durch ihre nur bedingte Kultivierbarkeit und begrenzte Verfügbarkeit einer großtechnischen Nutzung entgegensteht, ist dieser Befund von besonderem Interesse. Wenn ein Mikroorganismus Ursprung der aktiven Substanzen ist, so eröffnet dies die Aussicht auf die Kultivierung in biotechnologisch großem Maßstab. Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen aus dem marinen Lebensraum, lag daher der Schwerpunkt dieser Untersuchungen auf der Isolation der Organismen und der Eluierung ihres Metabolitenspektrums. Die Beschreibung der Lebensgemeinschaften war bisher oft nachrangig (Abrell et al. 1996a, Amagata et al. 1998, Bultel-Poncé et al. 1998, 1999, De Rosa et al. 2000, Ivanova et al. 2000, Ui et al. 2001). Es gibt bereits umfassende Untersuchungen zu endobiontischen Bakterien und verschiedenen Algen einiger Schwammarten. Über den Status von pilzlichen Endobionten liegen bisher keine fundierten Beschreibungen vor (Vacelet und Donadey 1977, Wilkinson 1978a-c, 1987, De Vos et al. 1991, Rützler und Muzik 1993, Burja et al. 1999).

1.1 Biologie von Schwämmen

Schwämme sind die älteste evolutionäre Metazoengruppe, die als nächste Verwandte der Urmetazoen gilt. Sie existieren seit dem frühen Kambrium vor 600 Millionen Jahren (Bergquist 1978, Müller 2001). Bisher sind etwa 9000 Arten, hauptsächlich aus tropischen Riffen aber auch aus gemäßigten Breiten bis hin zu den Polregionen beschrieben (Osinga et al. 1999, Cerrano et al. 2000, Müller 2001, Hentschel et al. 2002). Ihre Lebensweise ist sessil, dabei besiedeln sie sowohl hartes als auch weiches Substrat von der oberen Gezeitenzone bis in die Tiefsee (Bergquist 1978, Simpson 1984). Aufgrund des Skelettaufbaus werden die Schwämme in drei Klassen aufgeteilt: 1. die Glasschwämme (Hexactinellida) mit sechsstrahligen Silikatnadeln (Spiculae) und einem syncytialen Gewebe, 2. die Hornschwämme (Demospongiae) mit Silikatspiculae und/oder einem faserigen Skelett aus kollagenen Fasern und 3. die Kalkschwämme (Calcarea) mit einem Mineralskelett, das vollständig aus Kalziumkarbonat besteht (Bergquist 1978, Hartman 1983, Simpson 1984, van Soest et al. 2000).

Bergquist (1978) definiert Schwämme kurz als festsitzende filtrierende Metazoen, die eine einschichtige flagellenbesetzte Zellschicht zur Erzeugung eines unidirektionalen Wasserstroms durch ihren Körper benutzen. Tatsächlich besitzen Schwämme eine sehr einfache Organisation. Sie bestehen aus einem einschichtigen Epithel, das sowohl die begrenzende Körperoberfläche (Exopinacoderm) bildet, als auch das innere, oft weit verzweigte Kanalsystem der Schwämme auskleidet (Endopinacoderm). Innerhalb des Kanalsystems liegen die Kragengeißelkammern (Choanosomen), Ausbuchtungen im wasserführenden System die von flagellentragenden Choanocyten gebildet werden. Neben der passiven Strömung (Vogel und Bretz 1971) sind sie für den gerichteten Wasserstrom verantwortlich und somit für die Aufnahme von Nahrungspartikeln und die Versorgung mit sauerstoffreichem Seewasser, sowie der Abfuhr von Stoffwechselendprodukten (Bergquist 1978, Simpson 1984, Osinga et al. 1999).

Das Nahrungsspektrum der Schwämme ist weit gefächert und reicht von gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) über Bakterien und Protisten bis zum Phyto- und Zooplankton. Dabei können saisonale Schwankungen der Umweltfaktoren, wie Temperatur, Organismenverfügbarkeit, Photoperioden etc. zu deutlichen Verschiebungen

des Nahrungsgefüges führen (Wilkinson 1978b, Vacelet und Boury-Esnault 1995, Ribes et al. 1999, Osinga et al. 1999). Bakterien stellen mit etwa 75% der Gesamtkohlenstoffaufnahme die Hauptnahrungsorganismen der Schwämme (Bell et al. 1999, Ribes et al. 1999). Das Phytoplankton macht durchschnittlich 10% der Schwammnahrung aus. Dies kann sich bei einigen Arten, wie karnivoren Tiefseeschwämmen ohne wasserführende Kanalsysteme auch deutlich erhöhen (Reiswig 1971, Simpson 1984, Witte et al. 1997, Vacelet und Boury-Esnault 2002). Die Pumpleistung der Schwämme ist enorm und liegt bei 1 Liter Seewasser pro Stunde und cm^3 Körpervolumen (Reiswig 1971).

Das Kanalsystem der Schwämme wirkt als abgestuftes Siebsystem für Nahrungspartikel. Die Ostien, die Einströmöffnungen an der Schwammoberfläche, begrenzen durch ihren Durchmesser die Größe der aufzunehmenden Organismen auf etwa $50\mu\text{m}$ (Hartman 1983). In kaskadenartigen Abstufungen der Durchmesser der einführenden Kanäle, der Prosopylendurchmesser (Eintrittsöffnung in die Choanosomen), bis hin zu den Spalten zwischen den Mikrovilli, die alle Flagellen der Choanocyten umgeben, wird die aufnehmbare Partikelgröße immer weiter reduziert (Hartman 1983, Weissenfels 1989). Neben den kleineren Partikeln, die von den Zellen der Kragengeißelkammern gut zurückgehalten und aufgenommen werden können, sind die Pinacocyten der Schwammoberfläche und Kanalwandungen zusätzlich zur Aufnahme größerer Nahrungspartikel fähig (Simpson 1984, Gaino et al. 1994, Vacelet und Boury-Esnault 1995, Turon et al. 1997, Ribes et al. 1999).

Zwischen den äußeren Epithelien liegt das Mesohyl, ein mesenchymatischer Raum mit verschiedenen amöboid beweglichen Zelltypen. Neben den totipotenten Archäocyten, die sowohl für den Nahrungstransport als auch die Defäkation im Schwamm verantwortlich sind, gibt es noch weitere spezialisierte Zelltypen. So sezernieren beispielsweise die Skleroblasten die Skelettnadeln, die Spongioblasten bilden die Kittsubstanz des Skeletts, das Spongin und die „Kugeligen Zellen“ (spherulous cells) besitzen große mit Granula gefüllte Vakuolen, denen man die Lagerung und Freisetzung von Metaboliten zuspricht. Echte Sinnesorgane, Nervenzellen und Muskeln fehlen den Schwämmen, allerdings besitzen sie kontraktile Zellen im Bereich des Oscularrohres (Bergquist 1978, Simpson 1984, Uriz et al. 1996, Becerro et al. 1997).

Die meisten Schwämme reproduzieren sich geschlechtlich, aber einige Schwämme sind auch zu ungeschlechtlicher Fortpflanzung durch Knospung, Zerteilung oder der

Ausbildung von Gemmulae fähig, die auch als Überdauerungsstadien fungieren. Die sexuelle Reproduktion entspricht der anderer Invertebraten, allerdings besitzen Schwämme keine Gonaden. Spermatocyten entwickeln sich aus Choanocyten, Archäocyten wandeln sich zu Oocyten um. Die Befruchtung findet entweder im Schwamm statt, dann verlässt die entwickelte Larve nach einer gewissen Bebrütung den Schwamm oder die Gameten werden direkt freigesetzt (Bergquist 1978, Simpson 1984, Weissenfels 1989, van Soest et al. 2000).

Als sessile Tiere sind Schwämme dem Fraß anderer Organismen wie Fischen, Seeigeln und Schnecken ausgesetzt (Chanas und Pawlik 1995, Uriz et al. 1996), zudem stehen sie in ständiger Konkurrenz um besiedelbare Oberflächen (Simpson 1984). Lange Zeit galten die Skelettnadeln als mechanischer Schutz der Schwämme (Hartman 1983), neuere Untersuchungen zeigen aber, dass sie keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den Fraßschutz haben (Chanas und Pawlik 1995, Burns und Ilan 2003).

Von weit aus größerer Bedeutung ist die chemische Abwehr von Fraßfeinden, Standortkonkurrenten oder auch Mikroorganismen, die durch ein Überwuchern die Pumpaktivitäten der Schwämme einschränken könnten (Green et al. 1990, Becerro et al. 1994, Henrikson und Pawlik 1995, König und Wright 1996, Garson et al. 1998, Gillor et al. 2000, Thakur und Anil 2000, Zheng et al. 2000, Burns et al. 2003, Wiens et al. 2003). Manche Schwämme setzen Metabolite mit einer multidirektionalen Verteidigungswirkung gegen verschiedene Organismengruppen frei (Huysecom et al. 1990, Becerro et al. 1994, 1997), andere entlassen bioaktive Substanzen mit einer selektiven Wirkung (Amade et al. 1982, Tsoukatou et al. 2001). Der chemische Schutz der Schwämme ist nicht immer konstant, innerhalb einer Art entscheiden oft die morphologischen Werte durch unterschiedliche Standortbedingungen oder jahreszeitliche Schwankungen den Grad der Toxizität (Thompson et al. 1985, Becerro et al. 1997). Der Fraßschutz ist teilweise abhängig vom Entwicklungsstadium: Die Larven von *Crambe crambe* werden von Fischen gefressen, der adulte Schwamm jedoch nicht; andere Larven, wie die von *Dysidae avara*, bleiben dagegen von Fraß verschont (Uriz et al. 1996, Becerro et al. 1997).

Einige der Metabolite sind in den „*spherulous cells*“ der Schwämme nachgewiesen worden. Diese waren bei den untersuchten Spezies direkt unterhalb des Exopinaco-

derms lokalisiert, von wo aus sie die bioaktiven Substanzen durch die Schwammoberfläche sezerniert haben (Uriz et al. 1996, Becerro et al. 1997, Gillor et al. 2000).

1.2 Symbiosen von Schwämmen

Symbiosen stellen einen basalen Prozess in der Evolution dar. Einer der Hauptantriebe der Evolution war die Transformation von Bakterien in Zellorganellen der Eukaryotenzellen, wie Mitochondrien und Plastiden. Diese Organellen brachten den eukaryotischen Zellen fundamentale neue metabolische Möglichkeiten, wie die aerobe Atmung und Photosynthese (Alberts et al. 1994, Sarà et al. 1998). Eine Annahme ist, dass Schwämme das Produkt einer Symbiose von Choanoflagellatenkolonien und Bakterien sind, was zur Formation der kollagenen Matrix des Mesohyls geführt hat und somit die Basis für das Metazoenphylum Porifera darstellt (Wilkinson 1983).

Eine Vielzahl an Organismen ist mit Schwämmen in unterschiedlicher Weise vergesellschaftet. Gastropoda, Bivalvia, Polychaeta, Acari, Holothuroidea, Asteroidea, Pantopoda, Copepoda, Isopoda, Amphipoda, Pisces und Makroalgen besiedeln meist die wasserführenden Gänge und ernähren sich von Plankton oder organischen Partikeln, die der Wasserstrom mit sich führt. Einzelne ernähren sich auch vom Schwamm selber (Koukouras et al. 1992, 1996, Kunzmann 1996, Trautmann et al. 2000). Diese Assoziationen sind meist unspezifisch und die Besiedlung ist abhängig vom Volumen und Durchmesser der Schwammkanäle (Koukouras et al. 1992, 1996). Schwämme stellen im Vergleich zur Umgebung einen besonders nährstoffreichen Lebensraum dar, da sie partikuläres organisches Material durch ihr Filtersystem anreichern und selber stickstoffhaltige Substanzen ausscheiden (Santavy und Colwell 1990, Friedrich et al. 1999). Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Algen leben in symbiontischen Beziehungen mit Schwämmen (Wilkinson 1983, 1987, 1992, Larkum et al. 1987, Rützler 1988, Rosell 1993, Rützler und Muzik 1993, Bewley et al. 1996, Hill 1996, Mariani et al. 2000, Regoli et al. 2000, Webb und Maas 2002). Sie befinden sich meist extrazellulär im Mesohyl. *Aphanocapsa feldmanni* kommt intrazellulär in speziellen vakuolisierten Amöbocyten, den Cyanocyten, in den Schwämmen *Pericharax heteroraphis* und *Jaspis stellifera* vor (Wilkinson 1978c). Zoochlorellen sind auch in den ungeschlechtlichen Vermehrungs- bzw. Überdauerungsstadien

von Schwämmen gefunden worden, d.h. dass sie an die nächste Generation weiter gegeben werden (Simpson 1984).

Bakterien sind in allen Schwammarten zu finden und haben eine Bedeutung als Nahrungsorganismen und Symbionten. Pilzliche Isolate aus Schwämmen fallen durch ihre Produktion von neuen biologisch wirksamen Substanzen auf. Die Frage ist, ob diese Synthese von Sekundärmetaboliten von einer spezifischen Assoziation mit dem Wirt abhängig ist.

1.2.1 Bakterielle Symbionten in Schwämmen

In Schwämmen gibt es eine große Diversität an Bakterien, die hauptsächlich im intrazellulären Mesohyl, aber auch in Vakuolen bestimmter Zelltypen (Bakteriocyten) und selbst im Zellkern zu finden sind (Vacelet und Donadey 1977, Wilkinson 1978 a-c, Santavy und Colwell 1990, Preston et al. 1996, Althoff et al. 1998, Burja et al. 1999, Friedrich et al. 1999, Burja und Hill 2001, Webster et al. 2001b). Die Bakterien können sowohl in sehr hohen Dichten auftreten und bis zu 60% der Schwamm biomasse ausmachen (Santavy und Colwell 1990, De Vos et al. 1991), als auch nur in geringen Abundanzen im Mesohyl vertreten sein (Vacelet und Donadey 1977). Ihr Status ist nicht immer direkt erkennbar. Häufig sind es die gleichen Arten wie im Umgebungswassers (Madri et al. 1973, Wilkinson 1978b, Santavy und Colwell 1990), was nicht verwundert, da die Schwämme 60% bis 99% der Bakterien aus dem aufgenommenen Seewasser herausfiltern und diese als Nahrungsorganismen aufnehmen (Reiswig 1971).

Wilkinson et al. (1984) zeigten, dass Schwämme zwischen Nahrungs- und symbiontischen Bakterien unterscheiden können. Einerseits besitzen einige Bakterien Schleimkapseln, die als Schutz vor Phagocytose der Schwammzellen angesehen werden, von denen auch vermutet wird, dass der Schleim zum Teil durch die Schwämme selbst gebildet wird (Wilkinson 1978c, Friedrich et al. 1999). Andererseits werden Bakterien, die sich deutlich von den Bakterien des umgebenden Seewassers unterscheiden als Symbionten angesehen (Wilkinson et al. 1981). Ihre genaue Funktion wird allerdings noch nicht verstanden. Spekuliert wird über die Digestion von Material, das für die Schwammzellen nicht direkt nutzbar ist, bis hin zum Recycling von

unlöslichem Schwammkollagen (Wilkinson et al. 1979, 1981, Sarà et al. 1998). Versuche mit markierten organischen Verbindungen im Wasser von Aquarien haben gezeigt, dass diese erst von den Bakterien aufgenommen wurden und nach der Phagozytose der Bakterien auch in den Schwammzellen zu finden waren (Simpson 1984). Vacelet und Donadey (1977) fanden in unterschiedlichen Schwammarten mit dichtem Mesohyl diverse bakterielle Morphotypen, jedoch bei Schwämmen mit einem locker strukturierten Interzellularraum oft nur einen Bakterientyp, der in geringer Abundanz auftrat. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die morphologischen Unterschiede der Wirte für die Zusammensetzung der Endobiontengemeinschaft verantwortlich sein könnten.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass die Schwämme einen günstigen Lebensraum für die Bakterien darstellen. Sie werden in ausreichendem Maße mit Nährstoffen und Sauerstoff aus dem Seewasser versorgt und können noch zusätzlich Abfallprodukte des Schwammes verwerten (Wilkinson 1978c). Da einige Schwammarten im Winter vorübergehend ihre Pumpaktivität einstellen (Reiswig 1971), ist andererseits der mikrobielle Abbau von sich im Schwammkörper anreichernden Aminosäuren und Ammonium auch vorteilhaft für den Schwamm (Wilkinson 1978b). Zudem wurden fakultativ und strikt anaerobe Bakterien in Schwämmen nachgewiesen, die sich in microaeroben oder anaeroben Nischen des Schwammgewebes etablieren (Eimhjellen 1967, Imhoff und Trüper 1976, Schumann-Kindel et al. 1997, Gatti et al. 2002) bzw. spezielle Tiefseeschwämme ohne wasserführende Systeme besiedeln (Vacelet et al. 1996, Vacelet und Boury-Esnault 2002). Eine Steuerung der Besiedlung durch Bakterien könnte einerseits über vom Schwamm freigesetzte antibiotisch wirkende Metabolite geschehen, was eine Resistenz der Endobionten erfordert (Bergquist und Bedford 1978, Uriz et al. 1991, Muricy et al. 1993, Thakur und Anil 2000, Torres et al. 2002, Wiens et al. 2003), andererseits über die chemischen Schutzmechanismen der symbiontischen Mikroorganismen erfolgen (Wilkinson 1978a, Simpson 1984, Bewley et al. 1996, De Rosa et al. 2000).

Neben den frei im Mesohyl vorkommenden Mikroorganismen, kommen Bakterien in Vakuolen von speziellen Zelltypen, den Bakteriocyten oder Cyanocyten aber auch in Zellkernen vor (Wilkinson 1978c, Bigliardi et al. 1993, Sarà et al. 1998, Friedrich et al. 1999). Zwischen den endobiontischen Bakterien der Bakteriocyten von *Petrosia ficiformis* und der Vakuolenmembran wurden regelmäßig Kontaktstellen gefunden

(Bigliardi et al. 1993). Neben der Erweiterung des Nährstoffangebots können die Bakterien die Festigkeit des Sponginskeletts erhöhen (Sarà et al. 1998, Wilkinson 1978b) und den Schwamm durch die Freisetzung von Antibiotika vor Überwucherung durch andere Mikroorganismen schützen (Jayatilake et al. 1996, Bultel-Poncé et al. 1999, Ivanova et al. 2000, Schmidt et al. 2000, Kelecom 2002).

Mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die vertikale Weitergabe von assoziierten Bakterien an die nächste Generation über die Eier und Larven von einigen Schwämmen gezeigt. Die Weitergabe von methanotrophen Symbionten wurde aus karnivoren Tiefseeschwämmen beschrieben (Vacelet und Boury-Esnault 2002). Da einige der untersuchten Schwammarten keine Dotterzellen („nurse cells“) um die Oocyte ausbilden, wird den eingelagerten Bakterien auch die Funktion als Nahrungsreserve für die Embryonalentwicklung zugesprochen (Simpson 1984, Sciscioli et al. 1994, 2002, Lepore et al. 1995, Usher et al. 2001). Gallissian und Vacelet (1976) schließen dagegen eine Nahrungsfunktion der Bakterien in den Oocyten von *Veron-gia* aus.

Neben heterotrophen Bakterien findet man auch eine ganze Reihe an autotrophen Prokaryoten in Schwämmen (Eimhjellen 1967, Imhoff und Trüper 1976, Rützler 1985, 1988, Bewley et al. 1996, Webb und Maas 2002), die teilweise deutlich die Nahrungsphysiologie der Schwämme beeinflussen. Cyanobakterien sind besonders weit in indopazifischen Schwämmen verbreitet, die sich teils durch die große Anzahl von autotrophen Symbionten wie phototrophe Organismen verhalten (Wilkinson 1983). In diesen meist krustenbildenden Schwämmen besiedeln die Endobionten die lichtexponierten oberen 5mm des Gewebes und decken den Energiebedarf der Schwämme zu über 50% ab (Wilkinson 1983, 1992). Von den phototrophen Symbionten wurde ein Transport von Photosyntheseprodukten und besonders von Glycerin zum Wirt beschrieben (Larkum et al. 1987, Arillo et al. 1993). Darüber hinaus wurde ein Faktor gefunden, der von den Schwammzellen freigesetzt wird und bei den Mikroalgen eine erhöhte Glycerinproduktion und -freisetzung bewirkt (Wilkinson 1992). *Anthosigmella varians*, ein tropischer Bohrschwamm, besitzt viele symbiontische Zooxanthellen, die eine erhöhte Calciumcarbonatauflösung der Substrate durch den Schwamm bewirken, in dessen Folge der Schwamm eine erhöhte Gewebebildung, gesteigerte Ernährung und Reproduktionsrate zeigt (Hill 1996). Hier lassen sich also Anzeichen für eine echte mutualistische Vergesellschaftung aufzeigen.

Generell ist festzustellen, dass es viele Hinweise darauf gibt, dass die lange Koevolution von Schwämmen und Mikroorganismen zu einer besonderen Anpassung geführt hat (Wilkinson et al. 1981, Becerro et al. 1994). So fanden Hentschel et al. (2002) in verschiedenen Schwammarten aus unterschiedlichen Ozeanen sehr ähnliche Bakterien. Erforderlich dafür sind Erkennungsmechanismen zwischen den Bakterien und ihren Wirten (Müller und Schröder 1997). In *Halichondria panicea* haben Müller et al. (1981) ein Lectin gefunden, welches das Anheften und Wachstum von bestimmten Bakterien fördert. Da viele Symbionten weitgehend unkultivierbar sind, lassen sich die assoziierten Bakterien erst durch neue molekularbiologische Methoden, wie die DNA Isolation, Klonierung und Sequenzierung, sowie die *in-situ* Hybridisierung mit Gensonden nachweisen (Amann et al. 1995).

1.2.2 Pilzliche Symbionten in Schwämmen

Aus Schwämmen wurden sowohl Hyphenpilze als auch Hefen und Thraustochytrien (Chromista) isoliert (Roth 1962, Siepman und Höhnk 1962, Höhnk und Ulken 1979, Richter 1985, Sponga et al. 1999, Höller et al. 2000). Die meisten der Untersuchungen beruhen auf der Isolation der Pilze. Dabei wurden in erster Linie Pilze isoliert, deren Gattungen und Arten aus terrestrischen Habitaten bekannt sind, teilweise aber bisher unbekannte Stoffwechselprodukte bilden (Abrell et al. 1996a, 1996b, Varoglu et al. 1997, Amagata et al. 1998, Mohapatra et al. 1998, Sponga et al. 1999, Brauers et al. 2000, Höller et al. 2000, Ui et al. 2001, Malmstrøm et al. 2002). Bereits Siepman und Höhnk (1962) spekulierten, dass Hefen Vitamine an ihre Schwammwirte abgeben, da die aus Schwämmen kultivierten Hefen diese Stoffe auch in Kultur freisetzen. Thraustochytrien wurden aus verschiedenen Schwammarten des Mittelmeeres und der Nordsee isoliert (Höhnk und Ulken 1979, Richter 1985). Histologische Untersuchungen zur Struktur der möglichen Assoziation von Pilzen mit Schwämmen gibt es aber kaum. Höhnk und Ulken (1979) berichten von Konidienketten und keimenden Sporen im fixierten Schwammgewebe, Pilzhyphen konnten sie allerdings nicht nachweisen.

Bei einem großen Schwammsterben vor der Küste Honduras im Jahre 1939 wurde ein fädiger, nicht verzweigter Mikroorganismus in den geschädigten Bereichen des

Gewebes beschrieben. Es wurde vermutet, dass es sich dabei um einen Pilz handelt (Smith 1942, Lauckner 1980). Dosse (1940) beschreibt ein ähnliches Phänomen bei einer Schwammerkrankung vor den Bahamas 1938, wobei die Pilze am Übergang vom gesunden zum erkrankten Gewebe auftraten. Die einzige eindeutige Beschreibung einer Schwamm-Pilzassoziation stammt von den drei Vertretern der Gattung *Koralionastes*. Die auf Korallen lebenden Pilze bilden ihre Fruchtkörper nur in enger Assoziation mit krustenbildenden Schwämmen aus (Kohlmeyer und Volkmann-Kohlmeyer 1987, 1990).

Über den Status von marinen Pilzen wird noch diskutiert. Kohlmeyer und Kohlmeyer (1979) definieren „Marine Pilze“ als jene Gruppe von Pilzen, die in der Lage ist, im marinen und estuarinen Milieu zu wachsen und zu sporulieren, wobei die Einteilung nach physiologischen und ökologischen Eigenschaften und nicht nach taxonomischen Kriterien erfolgt (Johnson und Sparrow 1968, Meyers 1968, Hyde et al. 1998). Neben den obligat marinen Pilzen, die ausschließlich in marinen Habitaten leben, gibt es fakultativ marine Arten, die ursprünglich aus limnischen und terrestrischen Habitaten stammen, aber im Meer wachsen und sich dort eventuell fortpflanzen können (Kohlmeyer und Kohlmeyer 1979). Zur letztgenannten Gruppe gehörten die meisten aus Schwämmen isolierten Pilze (Höller et al. 2000). Der Großteil der marinen Pilze ist mit Algen assoziiert oder am Ligninabbau beteiligt (Kohlmeyer 1974, TeStrake und Aldrich 1984, Venkatesan 1990, Newell 1996, Hyde et al. 1998).

Unter den Zoosporen bildenden „niederen Pilzen“ (Chromista) gibt es sowohl parasitische als auch saprophytische Vertreter. Die wichtigste Gruppe, die Labyrinthulomycota besteht aus den fakultativ parasitischen Labyrinthulales in oder auf marinen Algen oder Seegrass und den Thraustochytriales, die man selten auf lebenden Pflanzen findet, da sie von deren antimikrobiellen Stoffen gehemmt werden. Ihre Rolle liegt eher in der Mineralisation von Phyto- und Zooplanktondetritus im Sediment (Schauermann 1993, Raghukumar 2002).

Die meisten Tiere sind resistent gegen einen pilzlichen Befall und werden höchstens von spezialisierten pathogenen Pilzen befallen (Carlile et al. 2001).

Pilze aus marinen Habitaten bilden eine Vielzahl an neuen Naturstoffen (König und Wright 1996, Pietra 1997, Jenkins et al. 1998, Jensen und Fenical 2000). Einige Untersuchungen zeigen ein höheres Potential zur Bildung aktiver Substanzen bei obligat marinen Pilzen auf (Cuomo et al. 1988), andere dagegen bei marinen Isolaten

terrestrischer Gattungen (Toske et al. 1998, Christophersen et al. 1999, Jensen und Fenical 2000). Ihre biologische Aktivität reicht dabei von antibakterieller und -fungaler Wirkung bis hin zu möglichen Symbiose relevanten Stoffen (Cuomo et al. 1988, Biabani und Laatsch 1998).

1.3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung der Bakterien- und Pilzgemeinschaften in verschiedenen mediterranen Schwammspezies, wobei insbesondere die Frage beantwortet werden sollte, ob die ausgewählten Schwämme übereinstimmende Endobionten besitzen oder aber artspezifische Vergesellschaftungen aufweisen. Zur Beantwortung der Frage sollten die mikrobiellen Gemeinschaften sowohl durch die Kultivierung der Organismen erfasst werden, als auch die nichtkultivierbaren Mikroorganismen mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden (Klonierung, SSCP) nachgewiesen und ihr Spektrum im Gewebe mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung dargestellt werden.

Die aus den Schwämmen isolierbaren Pilze sollten im Rahmen des BMBF-Projektes „Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen“ in Kooperation mit den chemischen Arbeitsgruppen von Prof. Bringmann (Universität Würzburg), Prof. Proksch (Universität Düsseldorf) und Dr. Günther (Zenaris AG, Frankfurt) auf ihre Produktion von biologisch wirksamen sekundär Metabolite hin untersucht werden.

2 Untersuchungsgebiete und Probennahme

2.1 Untersuchungsgebiete

Zwischen 1999 und 2001 wurden drei Probensammlungen im Mittelmeer an verschiedenen Standorten um die Insel Elba (Italien) durchgeführt. Weitere Mittelmeerproben stammen von der Küste der Insel Giglio (Italien) und Vergleichsproben aus dem Atlantik vor Roscoff (Frankreich). Insgesamt wurden 17 verschiedene Schwammarten mit unterschiedlichen Ansätzen bezüglich ihrer assoziierten Mikroorganismen untersucht.

Tab. 2.1: Probenstandorte

	Probenort- bez.	Probenort	Koordinaten
Elba (Italien)	T1	Capo Sant' Andrea	42°48'25"N/10°08'25"E
Elba (Italien)	T2	Punta di Fetovaia	42°43'24"N/10°09'31"E
Elba (Italien)	T3	Scoglio della Triglia	42°43'57"N/10°16'13"E
Elba (Italien)	T4	Capo di Fonza	42°55'5"N/10°17'E
Elba (Italien)	T5	Secca di Corallo	42°44'5"N/10°17'3" E
Elba (Italien)	T6	Bahia di Fetovaia	42°43'24"N/10°09'31"E
Elba (Italien)	T7	Cala del Fico	42°44'97"N/10°16'76" E
Giglio (Italien)		Bucht von Campese, Fenaio	
Roscoff (Frankreich)		Schwämme vom Probenversand der Biologischen Station Roscoff	

2.2 Probennahme

Ganze Schwammspezies wurden vorsichtig mit einem Messer an ihrer Basis vom Untergrund abgelöst. Unter Wasser wurden sie in sterilisierte verschließbare Behälter überführt und so an die Wasseroberfläche gebracht. In den verschlossenen Gefäßen blieben sie bis zur Aufarbeitung im Labor. Wasserproben wurden in 2-4m Entfernung zu den Schwammstandorten entnommen. Mit einer Spritze wurde Sediment aus der unmittelbaren Schwammumgebung aufgesogen. Bei den Probennahmen wurde die jeweilige Wassertiefe und Wassertemperatur bestimmt. Die Salinität lag an den Elbastandorten bei 36,5‰. Eine genaue Beschreibung der Probenstandorte um Elba gibt Hiort (2002), der Giglio-Probenorte Ziebis et al. 1996.

Tab. 2.2: Untersuchte Schwammproben

Proben-Nr.	Schwammart	Probenorte	Wassertiefe (m)	Temp. (°C)	Probennahme
E99-1	<i>Ircinia fasciculata</i> SCHMIDT	T1	10	14	4/1999
E99-2	<i>Chondrosia reniformis</i> NARDO	T2	16	15	4/1999
E99-3	<i>Axinella damicornis</i> (ESPER)	T3	12-20	16	4/1999
E99-4	<i>Agelas oroides</i> (SCHMIDT)	T2	10-16	15	4/1999
E99-5	<i>Acanthella acuta</i> SCHMIDT	T2	15-21	13	4/1999
E99-6	<i>Spongia officinalis</i> LINNÉ	T1	11	15	4/1999
E99-7	<i>Hamigera hamigera</i> GRAY	T1	10	14	4/1999
E99-8	<i>Petrosia ficiformis</i> POIRET	T1	11	14	4/1999
E00-1	<i>Chondrosia reniformis</i> NARDO	T4	11-14	16-17	5/2000
E00-2	<i>Petrosia ficiformis</i> POIRET	T1	11-14	16-17	5/2000
E00-3	<i>Agelas oroides</i> (SCHMIDT)	T2	14-20	15	5/2000
E00-4	<i>Acanthella acuta</i> SCHMIDT	T2	14-20	15	5/2000
E00-5	<i>Oscarella lobularis</i> (SCHMIDT)	T4	26-32	14,5	5/2000
E00-6	<i>Haliclona valliculata</i> (GRIESSINGER)	T4	40	14	5/2000
E00-7	<i>Hamigera hamigera</i> GRAY	T1	5-7	18	5/2000
E00-9	<i>Aplysina cavernicola</i> SCHMIDT	T4	40	14,5	5/2000
E00-11	<i>Leuconia aspera</i> SCHMIDT	T6	1-3	18	5/2000
E00-12	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T5	25	14,5	5/2000
E00-13	<i>Ircinia fasciculata</i> SCHMIDT	T1	5-6	17	5/2000
E00-16	<i>Hemimycale columella</i> BOWERBANK	T2	4-6	15	5/2000
E00-17	<i>Axinella damicornis</i> (ESPER)	T2	12-14	n.b.	5/2000
E00-24	<i>Spongia officinalis</i> LINNÉ	T1	13-14	19	5/2000
E01-1	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T2	20	n.b.	4/2001
E01-2	<i>Sycon raphanus</i> (SCHMIDT)	T3	13-15	n.b.	4/2001
E01-3	<i>Chondrosia reniformis</i> NARDO	T3	13-15	n.b.	4/2001
E01-4	<i>Acanthella acuta</i> SCHMIDT	T3	13-15	n.b.	4/2001
E01-5	<i>Clathrina clathrus</i> (SCHMIDT)	T3	13-15	n.b.	4/2001
E01-6	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T3	13-15	n.b.	4/2001
E01-7	<i>Agelas oroides</i> (SCHMIDT)	T3	13-15	n.b.	4/2001
E01-8	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T2	n.b.	n.b.	4/2001
E01-9	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T2	15	n.b.	4/2001
E01-10	<i>Ircinia fasciculata</i> SCHMIDT	T2	17,5	n.b.	4/2001
E01-11	<i>Ircinia sp. 2</i>	T2	17	n.b.	4/2001
E01-12	<i>Ircinia sp. 3</i>	T2	13	n.b.	4/2001
E01-13	<i>Spirastrella cunctatrix</i> SCHMIDT	T2	13	n.b.	4/2001
E01-14	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T7	17,5	n.b.	4/2001
E01-15	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T7	18	n.b.	4/2001
E01-16	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T7	13-19	n.b.	4/2001
E01-17	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT	T7	15	n.b.	4/2001
R01-1	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT		n.b.	n.b.	9/2001
G01-1	<i>Axinella verrucosa</i> SCHMIDT		12-22	n.b.	10/2001

E01-1 sieben Parallelproben

E01-6 zwei Parallelproben

E01-16 vier Parallelproben

R01-1 fünf Parallelproben

G01-1 fünf Parallelproben

Die Probennahme um Elba erfolgte durch die Taucher des Institutes für Meereswissenschaften „Hydra“ in Fetovaia, die Probenbeschaffung von Giglio durch C. Wild, Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen und im Atlantik durch Taucher der Biologischen Station Roscoff.

Die Schwämme wurden nach der Entnahme neben der eigenen Bestimmung auch von A. Spohr oder C. Lott vom Institut für Meereswissenschaften „Hydra“ bestimmt. Zur Überprüfung der Determination wurden ethanolfixierte Schwammstücke der Elba-Proben von 1999 und 2000 (außer *O. lobularis*), sowie *Axinella verrucosa* von Elba, Giglio und Roscoff aus dem Jahr 2001 von Prof. Dr. R.W.M. van Soest am Zoologischen Institut der Universität Amsterdam nachbestimmt.

2.3 Aufarbeitung der Schwammproben

Im Labor des Institutes für Meereswissenschaften „Hydra“ wurden die Schwämme in Behälter mit sterilfiltriertem (0,2µm) Seewasser überführt. Für die verschiedenen Aufarbeitungen wurden die Schwämme mit einem sterilisierten Skalpell zerteilt. Teilproben der Schwämme wurden in 70%igem Ethanol oder 2,5%igem Glutaraldehyd für die histologischen Untersuchungen fixiert. Die Glutaraldehydproben wurden entweder gekühlt gelagert oder direkt anschließend mit Osmiumtetroxid nachfixiert und bis zu 70 prozentigem Aceton entwässert und so gekühlt gelagert. Die Schwammproben für die molekulargenetische Bearbeitung und den Enzymnachweis wurden tiefgefroren und auf Trockeneis zum Alfred-Wegener-Institut transportiert, wo sie bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert wurden. Die Schwammproben von Roscoff wurden in Seewasser transportiert und im Heimatlabor eingefroren. Die mikrobiologische Aufarbeitung erfolgte direkt nach der Probennahme.

2.4 Hälterungsansatz

Mit dem Hälterungsansatz sollte getestet werden, ob Mikroorganismen in *Axinella verrucosa*, bei den im Vergleich zum natürlichen Standort veränderten Bedingungen im Aquarium, stark proliferieren oder das Schwammgewebe schädigen. Sechs Individuen von *A. verrucosa* wurden für sechs Tage in einem sterilisierten und mit sterilisiertem (0,2 µm) Seewasser gefüllten Aquarium bei Raumtemperatur gehalten. Das Wasser wurde alle zwei Tage erneuert und der Ansatz belüftet. Nach sechs Tagen wurden fünf der Proben wie die anderen Schwammproben aufgearbeitet. Ein Schwamm wurde vor der Bearbeitung noch weitere acht Tage in einem kleinen Kunststoffgefäß ohne Belüftung gehalten.

3 Material und Methoden

3.1 Morphologische Untersuchung der Schwämme

3.1.1 Lichtmikroskopie

Die frischen Schwammproben wurden mit einem Binokular (Olympus, Tokyo) mit einer bis 128-fachen Vergrößerung direkt auf Endo- und Epibionten hin untersucht und fotografisch dokumentiert (Olympus OM40, Tokyo, Kodak Elitechrom 400).

Um möglichst große Gewebestücke auf ihre Besiedlung hin untersuchen zu können, wurden neben Handschnitten bis zu 1,5cm breite Schwammstücke mit einem Vibratom (Leica VT1000S, Wetzlar) mit einer Dicke von 100µm geschnitten. Die Schnittpräparate wurden anschließend entweder mit der Silberfärbung nach Gomori oder mit Toluidin Blau für die Hellfeldmikroskopie oder mit Calcofluor White für die Epifluoreszenzmikroskopie gefärbt. Mit der Gomorifärbung werden spezifisch Pilzwände, Basallaminae und Membranen dunkelbraun bis schwarz angefärbt, der Calcofluor White Fluoreszenz Brightener 28 (Sigma, St. Louis) färbt Pilzwände. Die Toluidin Blau-Markierung ist eine Übersichtsfärbung.

Die Chemikalien, die im Folgenden ohne Herstellerangaben aufgelistet sind, stammen von der Firma Merck (Darmstadt).

3.1.1.1 Vibratomschnitte

Die in Ethanol (70%) fixierten Schwammstücke wurden nach dreimaligem waschen (je 20min) in Phosphatpuffer (1xPBS, Sigma, St. Louis), für 3 Stunden in 5-10%iger Flusssäure entkieselt (Kieselschwämme). Die Kalkschwämme wurden mit 10% EDTA, 10% Na-Hydroxyd, 10% Tris-HCl in a. bidest. über Nacht entkalkt. Vor der Einbettung wurden die Proben wieder dreimal für 20min mit 1xPBS gewaschen. Dann kamen die Proben für einige Minuten in auf 50°C vorgewärmte Gelatine (15-30%, Sigma, St. Louis). Die Schwammproben wurden dann in einer eisgekühlten Histologieform in Gelatine eingebettet. Nach Entfernung der probenfreien Stücke konnte der Gelatineblock auf den Vibratom-Halter geklebt werden. Die Probe wurde unter eisgekühltem PBS geschnitten,

damit die Probe ihre Festigkeit behielt. Die 100µm dicken Schnitte wurden auf einen Objektträger übertragen und anschließend getrocknet. Nun konnten die Schnitte entweder direkt gefärbt oder bei -20°C eingefroren werden.

3.1.1.2 Histologische Färbungen

Bei der Gomori-Silberfärbung wurden die Schwammschnitte für 1 Stunde in Chromsäure inkubiert. Anschließend wurden die Präparate gründlich mit Leitungswasser gespült und die restliche Chromsäure mit Natriumbisulfit-Lösung ausgewaschen. Nach mehrmaligem Waschen in a. dest. kamen die Schnitte in vorgewärmte Methenaminsilbernitrat-Lösung für 30-90min, bei 60°C. Ergab die mikroskopische Kontrolle eine gute Färbung, so wurden die Proben sechsmal in a. dest. gewaschen und dann für 5min mit Goldchlorid-Lösung nachgefärbt. Nach erneutem Waschen und anschließendem Entwässern, wurden die Proben mit Entellan eingedeckt (nach Grocott 1955).

Lösungen:

- 5% Chromsäure
- 5% Silbernitratlösung
- 3% Methenaminlösung
- 5% Boraxlösung
- Methenaminsilbernitrat-Vorratslösung

5ml	5% Silbernitrat-Lösung
100ml	3% Methenamin-Lösung
- Methenamin-Silbernitrat-Arbeitslösung

2ml	5% Borax
25ml	a. bidest.
25ml	Methenaminsilbernitrat-Vorratslösung
- 1% Natriumbisulfit
- 0,1% Goldchlorid
- 2% Natriumthiosulfat

Für die Toluidinblau- (0,15% TB in a. dest.) und Calcofluor White- (0,1%ige Lösung in a. dest., Sigma, St. Louis) Färbung, wurden die Schnitte für 30sec. mit den Farbstoffen

überschichtet und anschließend mit a. dest. gewaschen. Nach dem Eindecken konnten die Präparate direkt ausgewertet werden.

3.1.1.3 Kollagenasenachweis

Kathepsin B ist eine Matrix-degradierende Zysteinprotease, die an verschiedenen kollagenabbauenden Prozessen beteiligt ist. Zum Kollagenasenachweis wurden mit einem Gefriermikrotom (MICROM HM 500 OM, Wallendorf) 10µm dicke Schnitte von unfixierten tiefgefrorenen *Axinella verrucosa*-Proben angefertigt. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden die Proben für eine Stunde mit der Inkubationslösung überschichtet und bei 37°C in einer feuchten Kammer gehalten. Nach dem Waschen mit N-Ethylamid-Lösung bei 37°C (10min) wurden die Schwammproben für 30min in Fast Blue BB (Sigma, St. Louis) bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben gründlich mit a. dest. gewaschen und für 5min mit Kupfersulfat stabilisiert. Nach dem erneuten Waschen mit a. dest. konnten die Schwammschnitte in Glyzeringelatine eingedeckt werden (Van Noorden und Frederiks 1992).

Parallel zum Färbeansatz mit dem Substrat (H-arg-arg-4 MβNA*3HCl, Bachem, King of Prussia), wurden Kontrollmarkierungen mit dem Substrat und einem Inhibitor (Leupeptin, AppliChem, Darmstadt) und Ansätze ohne Substrat durchgeführt.

Lösungen:

- Inkubationslösung:

10ml	Citratpuffer 0,1M pH 4,5
1,8g	Polyvinylalkohol
100µl	EDTA (38mg/1 ml)
100µl	Dithiothreitol (152mg/1ml, Böhringer, Mannheim)
100ml	L-Cystein (33mg/1 ml)
200µl	Substrat (1mg H-arg-arg-4 MβNA*3HCl/10 µl DMSO)

- N-Ethylmaleimid-Lösung: 125mg N-Ethylmaleimid / 100ml Phosphatpuffer 0,1M, pH 8
- Fast Blue BB-Lsg.: 25mg Fast Blue BB / 100ml Phosphatpuffer 0,1M, pH 8
- Kupfersulfat-Lsg.: 2,5g Kupfer(II)-sulfat / 100ml a. dest.

3.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden etwa 5x5mm große Stücke aus dem frischen Schwammgewebe in Glutaraldehyd (2,5%) für 2 Stunden fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit 0,2M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,0) erfolgte die Nachfixierung in 2%igem Osmiumtetroxid für 2 Stunden in Na-Cacodylatpuffer. Vor der Entkieselung oder Entkalkung (vgl. 3.1.1.1) wurden die Proben erneut dreimal für je 20min mit Cacodylatpuffer gewaschen. Entweder wurde in die Aceton Entwässerungsreihe ein Blockkontrastierungsschritt mit 0,5%igem Uranylacetat in Aceton (30%) eingefügt oder die Kontrastierung erfolgte an den Schnitten. Nach der Entwässerung wurden die Proben langsam mit einem Aceton:Spurr-Harz (SERVA, Heidelberg) Verhältnis von 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 jeweils für 2 Stunden mit einem Abschluss in 100 prozentigem Spurr-Harz für 12 Stunden bei mehreren Lösungswechseln infiltriert.

Nach einem achtstündigen Aushärten bei 70°C konnten die Proben mit einer Fräse (Reicher TM 60, Depew) getrimmt werden. Auf einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert, Depew) wurden 50-70nm dicke Schnitte angefertigt und anschließend mit 1,5%igem Uranylacetat in Methanol (70%) und 2,5%igem Bleicitrat für jeweils 5min kontrastiert. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss EM 902 Elektronenmikroskop (Oberkochen).

Schwammproben die nach der Fixierung nicht direkt entnadelt wurden, sind bis zu 70%igem Aceton entwässert und darin gelagert worden. Später wurden die Proben dann entweder wieder gewässert und entkieselt/entkalkt oder eine Entkieselung fand erst an der Schnittfläche des Harzblockes statt.

Semidünnschnitte der Spurr-Proben wurden für lichtmikroskopische Untersuchungen genutzt.

3.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Schwammproben für die Rasterelektronenmikroskopie wurden wie die Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie fixiert und entwässert. Die Schwammstücke waren aber bis 1x1cm groß und die Proben wurden nicht entkieselt oder entkalkt. Nach der Entwässerung wurden Teilproben in flüssigem Stickstoff gefroren und gebrochen. Anschließend wurden die Proben Kritisch-Punkt getrocknet (Reichert CPD 010, Depew) mit Leitzinn auf Haltern fixiert und mit Gold besputtert (Edwards Coating System E306A, Crawley). Die Untersuchung erfolgte mit einem Philips XL30 ESEM Rasterelektronenmikroskop (Eindhoven).

3.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der mikrobiellen Endobiontengesellschaft wurden Schwammproben auf verschiedenen Nährmedien inkubiert und die kultivierbaren Mikroorganismen bestimmt.

3.2.1 Pilzisolierung und Kultivierung

Die Schwämme wurden aus den Sammelbehältern in Gefäße mit sterilfiltriertem (0,2µm) Seewasser überführt. Darin wurden sie für 30 min gehalten, damit sich die locker assoziierten Organismen von ihnen lösen und Mikroorganismen, die nicht vom Schwamm aufgenommen werden wieder aus den Kanalsystemen gespült wurden. Das Wasser in diesen Gefäßen wurde anschließend als „Spülwasser“ untersucht. Das restliche Wasser in den Schwämmen wurde anschließend vor der Ausplattierung der Schwammstücke ausgedrückt („Presswasser“). Aus dem Schwamminneren und der Schwammoberfläche wurden mit sterilisiertem Präparationsbesteck kleine Gewebestücke entnommen und entweder direkt auf verschiedene Nährmedien (siehe Anhang A1) aufgelegt oder in Seewasserflaschen mit Pinuspollen zur Köderung von pilzähnlichen Protisten gegeben. Mit einem Ultra-Turrax Dispergierer (IKA, Staufen) homogenisiertes Schwammmaterial wurde in verschiedenen Konzentrationen mit Seewasser verdünnt (1:3 bis 1:50) und mit einem Cellulose-Nitrat-Filter (Porengröße 0,65µm) filtriert. Mit

dessen Oberseite wurde ein Filterabdruck auf einer Nährplatte gemacht und der Filter anschließend mit der Probenseite nach oben auf einer weiteren Platte inkubiert. Von 0,1 bis 1ml des Homogenats wurde ebenfalls in Flaschen mit 25ml Seewasser zur Köderung von pilzähnlichen Protisten gegeben.

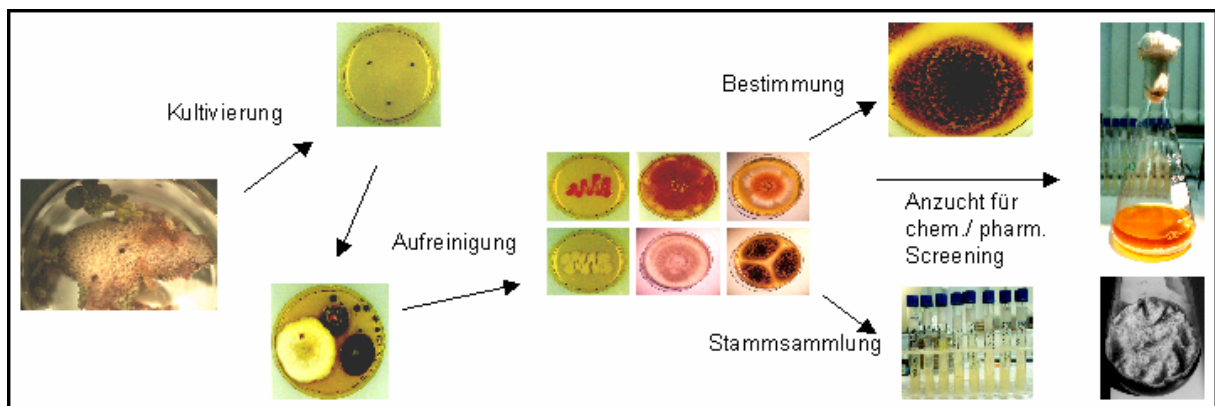


Abb. 3.1: Schema der Pilz-Isolation und Kultivierung aus den Schwämmen

Zur Bestimmung der Pilze des Umgebungswassers und des umgebenden Sedimentes wurden 10, 100 und 200ml des aus der Schwammnähe entnommenen Wassers filtriert und wie bei den Schwammproben ausplattiert. Es wurden 0,1ml der Sediment-Wasserprobe vom Schwammstandort direkt auf einem Nährboden ausplattiert, 1 und 5ml wurden erst filtriert (s. o.) und anschließend inkubiert. Mit 10, 50, 100 und 200ml der Standortwasserprobe, sowie 1, 3 und 5ml des Sediment-Wasser-Gemischs wurden Kultivierungsansätze mit Pinuspollen und sterilem Seewasser angesetzt. Die Isolation der pilzähnlichen Protisten und Pilze erfolgte in Anlehnung an Gaertner (1968) und Schaumann (1974).

Bei einigen Proben wurden die Schwammstücke vor der Inkubation zusätzlich für 1min in Na-Hypochlorid-Lösung (5% aktives Chlorid, Schulz et al. 1993) oder 70%igem Ethanol oberflächensterilisiert und anschließend in steriltriertem Seewasser gewaschen. Sobald Pilzkolonien ausgewachsen sind, wurden sie zur Gewinnung von Reinkulturen überimpft und vereinzelt.

Die aufgereinigten Pilze wurden für die Stammkultursammlung auf GPYNS Schrägagarröhrchen überführt und nachdem sie angewachsen waren bei 10°C gelagert. Zusätzlich wurden einige Stämme in 10%igem Glycerin in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die pilzähnlichen Protisten wurden in Seewasser mit sterilisierten Pinuspollen als

Köder gehalten.

Die Pilzbestimmung erfolgte nach morphologischen Gesichtspunkten besonders der reproduktiven Strukturen nach von Arx 1974, Raper und Fennell 1965, Pitt 1979, Fuller 1978, Barnett und Hunter 1987, Samson et al. 2000 und darin zitierter Literatur.

3.2.2 Pilzkultivierung für naturstoffchemische Untersuchungen

Für die Metabolitenextraktion wurden die Pilze in 300ml Wickerham Seewassermedium in 1L Erlenmeyerkolben angezogen. Die Flüssigkulturen wurden mit 5-10 Myzelscheiben (Durchmesser 0,5cm), die aus einer einwöchigen Vorkultur auf Wickerham-Agarplatten mit einem Korkbohrer ausgestochen wurden, beimpft. Nach vierzehntägiger Kultivierung bei 20°C als Standkultur wurden dem Ansatz 40ml Ethylacetat zugeführt und das Gemisch bei -80°C bis zur Aufarbeitung eingefroren. Parallel wurden ausgewählte Pilzisolat mit Medien unterschiedlicher Salinität kultiviert (Leitungswasser, 10, 20, 30 ‰).

3.2.3 Bakterienisolation und Kultivierung

Für die Bakterienisolation wurden wie bei der Pilzisolierung Schwammstücke möglichst steril entnommen und auf verschiedene Nährböden ausplattiert (siehe Anhang A2). Auswachsende Kolonien wurden überimpft, bis Reinkulturen vorlagen. Die Bestimmung der isolierten Bakterien erfolgte durch DNA-Extraktion und Sequenzierung der 16S rRNA.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Da sich ein Großteil der Mikroorganismen aus Umweltproben und besonders aus symbiontischen Gemeinschaften bisher noch nicht kultivieren lässt (Amann et al. 1995), wurden verschiedene molekularbiologische Techniken verwandt, um die Bakterien über ribosomale Gensequenzen bestimmen zu können.

3.3.1 DNA-Extraktion

3.3.1.1 DNA-Extraktion aus Schwammproben

Zur Bestimmung der Bakterien im Schwammgewebe wurde die Gesamt-DNA des Wirtes und der assoziierten Mikroorganismen extrahiert. Anschließend wurde die RNA der kleinen ribosomale Untereinheit der Bakterien (16S) für die taxonomische Einordnung selektiv amplifiziert und die Bakterien über deren Sequenz bestimmt. Zur Isolation wurden verschiedene Verfahren getestet.

CTAB-Methode:

- gefrorene Schwammprobe für 30min unter flüssigem Stickstoff mit Quarzsand mörsern
- zerkleinertes Material auf 2 Zentrifugenröhrchen aufteilen und je 3ml 3% CTAB-Lösung (65°C) zugeben
- 50µl Proteinase K (500µg/ml) zugeben und Ansatz bei 60-65°C für 2 h inkubieren, Probe anschließend mischen
- 24µl RNase (20µg/ml) zugeben und für 30min bei RT inkubieren
- 3ml Phenol/Chloroform zugeben und für 1min mischen
- zentrifugieren für 30min, 18°C, 10.000rpm
- obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in neues Röhrchen geben
- Zugabe von 3ml Chloroform/Isoamylalkohol, 1min mischen
- zentrifugieren: 30min, 18°C, 10.000rpm
- obere Phase abpipettieren
- Lösung mit gleicher Menge eiskaltem Isopropanol vorsichtig mischen

- Probe für 1,5h zur Ausfällung in -80°C Schrank oder über Nacht bei -20°C einfrieren
- zentrifugieren: 30min, 4°C, 10.000rpm
- Überstand abnehmen
- 1ml eiskalten 80% EtOH zugeben
- zentrifugieren: 10min, 4°C, 13.000rpm
- Alkohol abschütten, neuen eiskalten 80% EtOH zugeben, Probe durch ein- und aussaugen mit Pipette spülen
- zentrifugieren: 10min, 4°C, 13.000rpm
- EtOH abschütten und auf dem Kopf stehend für mindestens 30min trocknen lassen
- DNA in 100µl a. bidest. lösen

Lösungen: 3% CTAB-Lösung: 3g CTAB (Hexadecyltrimethyl-ammonium-bromide)
10ml 1M Tris-HCl (pH 8,0) auf 65°C vorwärmen
35ml 4M NaCl
200µl 2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis)
10ml 0,1M EDTA (pH 7,2)
auf 100ml mit a. dest. auffüllen

Die DNA-Extraktion wurde neben der CTAB-Methode mit folgenden kommerziellen DNA-Extraktionskits getestet. Das Ausgangsmaterial für die Extraktionen waren unter flüssigem Stickstoff mit sterilem Seesand gemörserte Schwammproben. Bei der Probe E01-9C wurde zuvor das Spongin mit Pinzetten aus dem Schwamm präpariert.

PAN Spin Plant Kit (PAN Biotech, Aidenbach)

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)

DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden)

Fast DNA SPIN Kit for soil (Q-Biogene, Carlsbad)

3.3.1.2 DNA-Extraktion aus Bakterienreinkulturen

Auf LB-Medium gewachsene Bakterienkulturen wurden steril mit einer Öse ohne Medium abgehoben und in 100µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) überführt. Der Ansatz wurde dann für 2min im Wasserbad gekocht und die Zellbestandteile bei 14.000rpm für 2min abzentrifugiert. Von dem DNA enthaltenen Überstand wurden 2µl als Template-DNA bei der PCR eingesetzt.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden mit Hilfe von Primern (Startfragmenten), die den begrenzenden Sequenzen der DNA-Abschnitte entsprechen und einer thermostabilen DNA-Polymerase DNA-Fragmente in einem zyklischen Prozess vervielfältigt.

PCR-Reaktionsansatz:

10x PCR Puffer	5µl
dNTP Mix (2,5mM)	2µl
Primer 1 (10pmol/µl)	1µl
Primer 2 (10pmol/µl)	1µl
Taq-Polymerase (5U)	0,25µl
H ₂ O	39,5µl
<u>Template DNA</u>	<u>1µl (ca. 100ng)</u>
Reaktionsvolumen	50µl

Taq-Polymerase: Amplitaq (Roche, Basel) mit den zugehörigen Puffern und Nucleotiden. Die Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Die PCR wurde im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) nach den in Tab. 3.2 aufgeführten Programmen durchgeführt. Dabei wurde die Polymerase entweder direkt in den PCR-Ansatz gegeben oder erst nach dem ersten Denaturierungsschritt (Hot Start). Die DGGE-PCR wurde mit einem Touchdown-Programm gemacht, bei dem die Annealingtemperatur zur Erhöhung der Spezifität am Anfang der PCR über der Schmelztempe-

ratur der Primer lag und dann schrittweise gesenkt wurde. Einige Ansätze wurden mit einer verschachtelten (nested) PCR gemacht. So wurde bei der DGGE-Analyse zuerst die Bakterien 16S rRNA aus der Schwammproben-Gesamt-DNA in einer PCR vervielfältigt und anschließend mit einer zweiten PCR die DGGE spezifischen Sequenzen amplifiziert. Nach dem gleichen Prinzip erfolgte bei einem SSCP-Ansatz zuerst die Vervielfältigung von Archaeobakterien rRNA bei anschließender PCR mit den SSCP-Primern.

Tab. 3.1: PCR-Bedingungen

Amplifikation	Zyklenanzahl	Denaturierung		Annealing		Elongation	
		Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit
Archae	1	94°C	5 min				
	35	94°C	1:30 min	55°C	0:30 min	72°C	3 min
	1					72°C	10 min
Bakterien	1	94°C	2 min				
	35	94°C	1 min	50°C	1 min	72°C	2 min
	1					72°C	10 min
SSCP	1	94°C	5 min				
	35	94°C	1 min	50°C	1:10 min	72°C	2 min
	1					72°C	5 min
DGGE	1	94°C	4 min				
	je 2	94°C	1 min	65-56°C	1 min	72°C	3 min
				Touchdown in 1°C Schritten			
	25	94°C	1 min	55°C	1 min	72°C	3 min
	1					72°C	7 min

Tab. 3.2: Benutzte PCR Primer

Name	Spezifität	E. coli-Nummerierung	Sequenz, 5'-3'	Zitat
Com 1	Bakterien-SSCP	519-536	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	Schwieger & Tebbe 1998
Com 2-Ph	Bakterien-SSCP	907-926	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-phosphoryliert	Schwieger & Tebbe 1998
8 forw.	Prokaryoten	8-27	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Kopp et al. 1997
1492 rev.	Prokaryoten	1492-1513	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	Kopp et al. 1997
GM5+clamp	Bakterien-DGGE	325-341	CCT ACG GGA GGC AGC AG + clamp	Muyzer et al. 1993
907RM	Bakterien-DGGE	907-926	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	Muyzer et al. 1995
ARCH20	Archae	2-20	TTC CGG TTG ATC CYG CCR G	Orphan et al. 2001
clamp			CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G	Muyzer et al. 1993

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis und zur Kontrolle der DNA-Extraktion, der Amplikons der PCR, der Klon-DNA und des Restriktionsverdau wurden DNA-Teilproben auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei lässt sich der Zustand der DNA und die Größe der erhaltenen Fragmente überprüfen. Die Agarose (0,8-2,0% in 1xTAE Puffer, Sigma, St. Louis) wurde durch aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C Ethidiumbromid (100 ng/ml, Sigma, St. Louis) zur DNA Färbung zugegeben. Nach dem Gießen und Polymerisieren des Gels wurden die Proben mit Auftrags- (0,05% Bromphenolblau, 40% w/v Glycerin in H₂O) und Laufpuffer (TAE) vermischt und aufgetragen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandert die DNA in Abhängigkeit von ihrer Ladung und der Länge unterschiedlich schnell in Richtung Anode. DNA-Fragmente gleicher Länge bilden Banden im Gel. Durch das parallele Auftragen von DNA-Leitern konnte die erhaltene Fragmentlänge bestimmt werden.

TAE-Puffer (50x): 242,28g Tris
 60ml Eisessig
 100ml 0,5 M EDTA
 auf 1L mit a. dest. auffüllen

3.3.4 Verdau der bakteriellen 16S rRNA zum Artenvergleich der Schwamm-Isolate

Zur Unterscheidung und dem Aufzeigen der Diversität der verschiedenen Bakterienisolate wurde die amplifizierte 16S rRNA mit Restriktionsendonucleasen geschnitten. Diese Enzyme erkennen je nach Spezifität 4-8 Basenpaare in einem DNA-Strang und schneiden diesen spezifisch bei bestimmten Zielsequenzen. Die dabei entstehenden unterschiedlich langen Fragmente kann man im Agarosegel sichtbar machen und die verschiedenen Bakterienarten daran unterscheiden.

Der Verdauansatz wurde, wie unten aufgeführt zusammengestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

10µl 16S rRNA PCR Produkt
3µl H₂O
0,15 µl BSA 10mg/ml (Promega, Madison)

1,5µl 10 x Puffer (Promega, Madison)
0,15µl RSA I (Promega, Madison)
0,1µl HAE III (Promega, Madison)

3.3.5 Klonierung der bakteriellen 16S rRNA PCR-Produkte

Mit einer Klonierung kann man DNA-Fragmente aus einem DNA-Gemisch auftrennen und vermehren. Dabei wird ein DNA-Stück in die Klonierungsstelle eines Plasmids (zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können) eingebaut. Anschließend werden die Plasmide mit dem Insert in kompetente Wirtszellen eingeschleust und diese vermehrt. Mit Hilfe einer Blau-Weiß-Selektion kann man den Klonierungserfolg testen. Die Klonierungsstelle des Plasmids liegt innerhalb des LacZ'-Gens, das neben anderen für die β -Galactosidaseaktivität verantwortlich ist. Ist das LacZ'-Gen durch die Insertion des DNA-Fragments zerstört, so kommt es nach einer Inkubation mit IPTG und X-Gal zu keiner Farbreaktion in den Bakterienkolonien. War der DNA-Einbau nicht erfolgreich, so exprimieren die Bakterien das α -Fragment der β -Galactosidase und die Bakterienkolonien färben sich blau (Mülhardt 2002).

Bei den Klonierungsansätzen wurde bakterielle DNA mit den Primern 8 forw. und 1492 rev. aus der Schwamm-Gesamt-DNA von *Axinella verrucosa* mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und die entsprechende Bande ausgestochen. Mit dem QIAquick Gel Extracting Kit (Qiagen, Hilden) wurde die DNA nach Herstellerangaben, allerdings mit einer MiniElute Säule (Qiagen, Hilden), aus der Agarose extrahiert und mit 10µl H₂O eluiert. Nach einer Extraktionskontrolle mit einer Teilprobe auf einem Agarosegel wurde das DNA-Fragment mit dem TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad) nach Herstellerangaben in kompetente *E. coli* Zellen kloniert. Die Bakterienlösung aus dem Klonierungsansatz wurde auf zwei LB-Medien Platten aufgeteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Helle Bakterienkolonien (mit Vektoreinbau) verschiedener Größe wurden mit einem sterilen Zahnstocher angestochen und in Kulturröhrchen mit 3ml LB-Medium über Nacht kultiviert (180rpm, 37°C).

Mit dem DNA-Extraktions-Kit (QIAprep Spin Miniprepkit, Qiagen, Hilden) wurde die DNA aus 1,5ml Bakterienlösung isoliert. Zur Kontrolle der genetischen Diversität erfolgte ein Verdau der Plasmid-DNA von Teilproben (vgl. 3.3.3).

Verdau der Plasmidproben: 13,5µl Plasmid-DNA
 2µl Puffer (10x-Puffer)
 0,5µl Enzymmix
 4µl H₂O

Es wurde ein 7-facher Verdau mit den Enzymen: EcoR I, Hind III, Sst I, Pst I, EcoR V, Xho I, Xba I (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe) über Nacht bei 37°C durchgeführt und das Ergebnis auf einem 1,5%igen Agarosegel kontrolliert.

Bakterienplatten LB-Medium:

1% Trypton
 0,5% Yeast Extract
 0,5% NaCl
 16g/L Agar
 pH 7,5

LB-Flüssigmedium:

1% Trypton
 0,5% Yeast Extract
 0,5% NaCl
 pH 7,5

jeweils mit 50µg/ml Kanamycin

3.3.6 Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP)

Beim Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (single strand conformation polymorphism, SSCP) nutzt man die Neigung von Nucleinsäuresträngen zur Basenpaarung. RNA und einzelsträngige DNA paaren sich durch fehlende komplementäre Stränge mit sich selber und nehmen dann oft hoch komplexe sequenzabhängige Konformationen ein. Die unterschiedlichen Konformationen bestimmen die Laufeigenschaften der gleich langen DNA-Fragmente im Polyakrylamidgel (Mülhardt 2002). Somit lässt sich die bakterielle DNA aufgrund ihrer Sequenzzusammensetzung und der daraus resultierenden Laufstrecke im elektrischen Feld voneinander trennen und die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft darstellen.

Mit den Primern Com1 und Com2 wurden etwa 400 Basen lange bakterielle DNA-Fragmente in einer PCR amplifiziert (vgl. 3.3.2). Nach einer Kontrolle der erhaltenen DNA im Agarosegel, wurde die DNA aufgereinigt (PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) und mit 50µl H₂O aus den Säulen gewaschen. Bei 26µl der Probe, wurde der DNA Strang mit dem phosphorylierten Primer Com2 abgebaut (+1µl Lambda-Exonuclease und 3µl Exonuclease 10x Puffer, 1 h, 37°C, New England Biolabs, Beverly). Die restlichen Proben wurden für die spätere Sequenzierung tiefgefroren. Die einzelsträngige DNA wurde gereinigt und in 10µl H₂O aufgenommen (PCR Purification Kit, Mini Elute, Qiagen, Hilden). Nun wurde die DNA mit 10 µl Auftragspuffer gemischt und für 2min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Es wurden 5µl der Probe auf 0,625-fache MDE-Acrylamidgelle mit einer Laufzeit von 16-20h, bei 400V, 8mA und 5W aufgetragen (Schwieger und Tebbe 1998).

Auftragspuffer: 950µl Formamid

10µl 1M NaOH

0,025% Bromphenolblau

0,025% Xylene Cyalone

20µl a. dest.

MDE-Acrylamidgel: 14,69ml H₂O

2,5ml 10xTBE-Puffer

7,81ml MDE-Lösung, 2x (Biozyme, Bangkok)

10µl TEMED (Sigma, St. Louis)

100µl 10% APS (Sigma, St. Louis)

10xTBE-Puffer: 108g Tris Base

55g Borsäure

40ml 0,5M EDTA, pH 8

mit a. dest. auf 1L auffüllen

Der Nachweis der Gelbanden erfolgte mit einer Silberfärbung. Nach einer 15-30min Fixierung mit 10%iger Essigsäure wurde das Gel 3x für 5min mit a. dest. gewaschen. Dann wurde es abgedeckt für 30min in frisch angesetzter Färbelösung inkubiert. Das Gel wurde unter fließendem a. dest. gewaschen und mit dem Entwickler bis zur gewünschten Intensität gefärbt. Nach dem Stoppen der Reaktion mit Essigsäure (10%)

und einem 30min Waschen in a. dest. wurde das Gel an der Luft getrocknet.

Färbelösung: 0,5g AgNO₃
0,75ml 37% Formaldehyd
500ml a. bidest.

Entwickler: 39,38g Na₂CO₃-10 hydrat
1,4ml 37% Formaldehyd
0,7ml 0,2% Na-Thiosulfat
600ml a. bidest.

3.3.7 Reamplifikation der SSCP-Banden

Einige DNA-Banden wurde mit verschiedenen Methoden aus dem getrockneten SSCP-Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, die DNA daraus extrahiert und in einer PCR wieder amplifiziert. Die erhaltene DNA konnte anschließend sequenziert werden.

Isolation nach Liang und Pardee (1997):

Die ausgestochenen Banden wurden in ein Reaktionsgefäß mit 100µl H₂O überführt und darin für 15min gekocht. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipetiert und 10µl 3M Na-Acetat, 5µl Glykogen (10mg/ml) und 450µl 100% EtOH zugegeben und die DNA bei -80°C ausgefällt (60min). Nach dem Zentrifugieren (10min, 13000rpm, 4°C) wurde der Überstand abgeschüttet und die Probe mit 200µl eiskaltem Ethanol (85%) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Ethanol abgeschüttet und die zurückbleibende DNA an der Luft getrocknet und dann in 10µl H₂O aufgenommen.

Isolation nach Mülhardt (2002):

Nach dem Ausstechen wurde das Gelstück zerschnitten und über Nacht bei 37°C in Eluationspuffer (0,5M Ammoniumacetat, 1mM EDTA) inkubiert. Dann wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Gelstücke erneut mit Eluationspuffer gewaschen und mit dem ersten Puffer gemischt. Nun wurde die 2-fache Menge eiskalten Ethanols zugegeben und der Ansatz zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgeschüttet und die Probe in Wasser aufgenommen und wie oben beschrieben mit Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

Bei der dritten Isolationsvariante wurde das Gelstück kurz mit 100µl H₂O gewaschen und die Probe über Nacht bei 4°C gehalten. Der Überstand wurde direkt in der PCR eingesetzt.

3.3.8 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Bei der DGGE werden DNA-Fragmente aufgrund des unterschiedlichen Schmelzverhaltens der Basen der DNA-Doppelhelix in einem Gel aufgetrennt. Die Basen G und C sind durch drei und die Basen A und T nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen im DNA-Molekül miteinander verbunden. Daraus ergibt sich eine stärkere Bindung und somit eine größere Schmelzstabilität der G-C Paarungen. Bei der DGGE wird die doppelsträngige DNA beim Durchlaufen des Gels durch eine Denaturierung immer weiter aufgetrennt und reduziert damit ihre Wandergeschwindigkeit. Damit sich die DNA-Stränge nicht vollständig voneinander trennen und damit schnell aus dem Gel herauslaufen, wird eine schmelzstabile G-C reiche Region an die DNA-Fragmente angehängt (GC-Klammer). Aufgrund der Sequenzunterschiede der einzelnen Bakterien und somit der Laufeigenschaften der DNA-Fragmente im Gel, lassen sich die vorherrschenden Bakteriengruppen in den beprobten mikrobiellen Lebensgemeinschaften darstellen (Muyzer et al. 1993, Muyzer und Smalla 1998).

Die Gesamt-DNA aus den Schwammproben wurde entweder direkt mit den DGGE Primern 907RM und GM5+clamp amplifiziert oder es wurde eine Vervielfältigung der Bakterien-DNA vorgeschaltet (nested PCR, vgl. 3.3.2). Nach dem Mischen mit dem Probenpuffer wurden die DNA-Proben auf ein kontinuierliches Gradienten-Gel aufgetragen und für 18 Stunden bei 60°C und 100V laufen gelassen. Durch die Färbung mit Sybr-Gold (25µl/250ml TAE-Puffer, MoBiTec, Göttingen) wurden die resultierenden Banden im Gel nachgewiesen (Muyzer et al. 1993). Die Gele wurden mit einem Gel-Dokumentations-System RH-5.1 (Herolab, Wiesloch) fotografiert.

Einige DNA-Banden wurden aus dem Gel geschnitten und über Nacht in 50µl H₂O bei 8°C inkubiert. Von dem Überstand wurden 2µl als Template in der PCR eingesetzt.

Lösungen:0%-Lösung:

22,5ml Bis-Acryl-Amid, 40% (BioRad, Herkules)
 3ml 50xTAE-Puffer (vgl.3.3.3)
 ad 150ml a. dest.

80%-Lösung:

22,5ml Bis-Acryl-Amid, 40%
 3ml 50xTAE-Puffer
 48ml Formamid
 50,4g Urea in 30ml a. dest.
 ad 150ml a. dest.

Aus der 0% und 80% Lösung werden die 0%, 20% und 70% Gel-Lösungen zusammen-
 gemischt:

<u>0%</u>	<u>20%</u>	<u>70%</u>
	2,75ml 80%	9,60ml 80%
5ml 0%	8,25ml 0%	1,40ml 0%
5µl TEMED	7µl TEMED	7µl TEMED
25µl 10% APS	40µl 10% APS	40µl 10% APS

3.3.9 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Seit einigen Jahren gewinnt die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung eine immer größer werdende Bedeutung in der mikrobiellen Ökologie. Mit ihr können bestimmte Populationen direkt in Umweltproben aufgrund von konstanten genotypischen Eigenschaften charakterisiert werden. Dies macht einen unabhängig von variablen phänotypischen Eigenschaften wie der Morphologie und eröffnet den Zugriff auf das breite Spektrum an bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen (Amann et al. 1997). Man unterscheidet zwischen zwei Sondentypen, den Polynucleotiden mit einer Länge von über 50 Nucleotiden und den Oligonucleotiden mit etwa 20 Nucleotiden. Für die meisten Anwendungen werden die Oligonucleotide bevorzugt, da sie kurz genug sind, um auch einfache Basenunterschiede zwischen der Sonden- und der Zielsequenz diskriminieren zu können und sie schnell und relativ kostengünstig hergestellt werden können (Amann et al. 1997). Es gibt bereits eine Vielzahl an bekannten Sonden für verschiedene Organismengruppen, die unter anderem in verschiedenen Datenbanken wie probeBase (www.microbial-ecology.de/probebase, Loy et al. 2003) zu finden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Sonden für die drei Domänen und verschiedenen Bakteriengruppen benutzt. Zusätzlich wurden spezifische Sonden für erhaltene 16S rRNA-

Sequenzen aus den Schwämmen generiert.

Mit einem Gefriermikrotom (MICROM HM500OM, Wallendorf) wurden aus den tiefgefrorenen Schwammproben ca. 10µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern auf-trocknen gelassen. Die Präparate wurden dann für 40min in Carnoy'scher Fixans (60% Ethanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) fixiert. Alternativ wurden gefrorene Schwammstücke direkt in den Fixierer gegeben und darin die Sponginfasern mecha-nisch vom restlichen Gewebe getrennt. Die erhaltenen Sponginfasern wurden auf Ob-jektträgern auf-trocknen gelassen. Nach der Fixierung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (50%, 70%, 100% EtOH, je 3min) und anschlie-ßend an der Luft getrocknet. Nun konnten die Proben entweder bei -20°C eingefroren oder weiter bearbeitet werden. Die Objekte wurden mit Hybridisierungspuffer mit den entsprechenden Sonden (2ng/µl) überschichtet und für 4,5 Stunden in einer feuchten Kammer bei 46°C inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgeschüttet und die Prä-parate 15min in vorgewärmtem Waschpuffer (48°C) gewasche n. Nach dem Abspülen mit a. dest. wurden die Proben mit Citifluor/DAPI (2µl DAPI (1µg/µl, ICN, Costa Mesa), 500µl H₂O, 1000µl Citifluor (University of Kent, Canterbury)) eingedeckt und bei 4°C gelagert (nach Friedrich et al. 1999).

Tab. 3.3: Benutzte Gensonden

Sonde	Spezifität	Sondensequenz (5'-3')	Targetposition (E. coli)	FA	Zitat
NON338		ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S (338-355)	0%	Wallner et al. 1993
EUB338	Bakterien	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338-555)	35%	Amann et al. 1990
EUK516	Eukaryoten	ACCAGACTTGCCCTCC	18S (502-517)	35%	Amann et al. 1990
ARCH915	Archaea	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S (915-934)	20%	Stahl und Amann 1991
ALF968	Alphaproteobakterien	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S (968-985)	20%	Neef 1997
BET42a	Betaproteobakterien	GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1027-1043)	35%	Manz et al. 1992
BETA Competitor		GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1027-1043)	35%	Manz et al. 1992
GAM42a	Gamaproteobakterien	GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1027-1043)	35%	Manz et al. 1992
GAM Competitor		GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1027-1043)	35%	Manz et al. 1992
SRB385	Deltaproteobakterien	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S (385-402)	35%	Amann et al. 1990
CF319a	Cytophaga	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S (319-336)	35%	Manz et al. 1996
HGC69a	Actinomyceten	TATAGTTACCACCGCCGT	23S (1901-1918)	25%	Roller et al. 1994
HGC Competitor		TATAGTTACGGCCGCCGT	23S (1901-1918)	25%	Roller et al. 1994
PLA46	Planctomyceten	GACTTGCATGCCTAATCC	16S (46-63)	30%	Neef et al. 1998
LGC354a	Firmicutes	TGGAAGATTCCCTACTGC	16S (354-371)	35%	Meier et al. 1999
Ax5-439	Axinella-Schwamm- symbiont Alphaprot.	CACCGGGGAGGATGATGA	16S (439-456)	30%	diese Arbeit
Ax23-200	Axinella-Schwamm- symbiont Deltaprot.	GGCCTCTCGTAGAAGCTAC	16S (200-218)	30%	diese Arbeit

Die benutzten Sonden waren mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppelt, da es mit diesem in den Schwammgeweben bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 550nm eine deutlich geringere Autofluoreszenz als bei mit Fluorescein gekoppelten Oligonucleotiden gab. Die Auswertung erfolgte an einem Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop mit Axio-cam Digitalkamera (Zeiss, Oberkochen), einer 50W Quecksilberlampe und spezifischen Filtersätzen (DAPI 365/395/397; Cy3 535-550/565/610-675). Parallel zu den Gewebeproben wurden Bakterien als Positiv- und Negativkontrollen markiert. Die benutzten Bakterien sind in Tabelle 3.3 aufgeführt, sie wurden mit den von der DSMZ empfohlenen Medien kultiviert.

Hybridisierungspuffer:

- 360µl 5M NaCl
- 40µl 1M Tris/HCl pH 8,0
- Formamid und MQ in Abhängigkeit von der Stringenz

% Formamid (v/v)	Formamid (µl)	MQ-H₂O (µl)
0	0	1.600
5	100	1.500
10	200	1.400
15	300	1.300
20	400	1.200
25	500	1.100
30	600	1.000
35	700	900
40	800	800
45	900	700

- 4µl 10% (w/v) SDS

Waschpuffer:

- 1ml 1M Tris pH 8,0
- 500µl 0,5M EDTA, (zwischen 20% und 60% Formamid, Sigma, St.Louis)
- NaCl je nach Stringenz

% Formamid in Hybridisierungspuffer	NaCl in mol/l	5M NaCl (µl)
0	0,9	9000
5	0,636	6300
10	0,45	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,08	700
40	0,056	460
45	0,04	300

- 50µl 10% (w/v) SDS
- ad 50ml mit MQ

3.3.10 Sondengenerierung für FISH

Die Sondenentwicklung erfolgte mit Hilfe des ARB-Programms (www.arb-home.de) nach der Anleitung von Hugenholz et al. (2002). Hierbei wurde bei der Auswahl der vom Computerprogramm errechneten und vorgeschlagenen Sonden darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur der Oligonucleotide größer als 57°C ist, damit die Hybridisierung mit Standardprotokollen erfolgen konnte (Hugenholz et al. 2002, Manz et al. 1992). Des Weiteren wurden die Sonden nach ihrer Anzahl an Basenunpaarungen zwischen der Sondensequenz und der ribosomalen DNA, sowie ihrer potentiellen Fluoreszenzintensität nach Fuchs et al. (1998) ausgewählt. Eine Testung der Spezifität der Oligonucleotide erfolgte durch Vergleiche der Sequenz mit verschiedenen Gendatenbanken (BLASTN: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Ribosomal Database Projekt II: <http://rdp.cme.msu.edu/html/>) und durch die Hybridisierung der Schwammschnitte bei verschiedenen Stringenzen (0-45% Formamid). Bei geringen Basenunpaarungen mit den Targetsequenzen wurden die Sonden an den nächst ähnlichen Bakterienarten getestet.

Tab. 3.4: Vergleichsbakterien zur Sondenkontrolle

Gruppe	Art	Stamm-Nr.
Alphaproteobakterien	<i>Rhodospirillum photometricum</i> Molisch 1907	DSMZ 121
	<i>Acetobacter oboediens</i> (Sokollek et al. 1998) Yamada 2000	DSMZ 11826
	<i>Acetobacter xylinus</i> (Brown 1886) Yamada et al. 1998	DSMZ 2004
Betaproteobakterien	<i>Zoogloea ramigera</i> Itzigsohn 1868	DSMZ 287
Gammaproteobakterien	<i>Shewanella putrefaciens</i> (Lee et al. 1981) MacDonell und Colwell 1986	DSMZ 9461
	<i>Colwellia psychrorythraea</i> Deming et al. 1988	DSMZ 8813
Cytophaga	<i>Cytophaga latercula</i> Lewin 1969	DSMZ 2041
Actinobakterien	<i>Brachybacterium tyrofermentans</i> Schubert et al. 1996	DSMZ 10673
	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> (Omelianski 1923) Takeuchi und Hatano 1998	DSMZ 8609
Planctomyceten	<i>Pirellula marina</i> Schlesner und Hirsch 1987	DSMZ 3604
	<i>Planctomyces brasiliensis</i> Schlesner 1990	DSMZ 5307
Archae	<i>Sulfolobus solfataricus</i> Zillig et al. 1980	DSMZ 5833
	<i>Mathanobacterium subterraneum</i> Kotelnikova et al. 1998	DSMZ 11074

3.3.11 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die erhaltenen DNA-Proben aus den Klonierungsansätzen und der DGGE- und SSCP-Reamplifikate wurden mit einem DNA-Aufreinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt und kommerziell sequenzieren gelassen (MWG-Biotech, Ebersberg, Qiagen, Hilden). Die Vollängensequenzierungen erfolgten mit M13 universal- und M13 reverse-Sequenzierungs-Primern, die Sequenzierungen von Teilsequenzen und der SSCP-Reamplifikate mit dem Primer Com1 und der DGGE-Reamplifikate mit dem Primer GM5.

Zur Einordnung der erhaltenen Sequenzen wurden diese bei einem Datenbankvergleich mit bekannten Sequenzen verglichen (Altschul et al. 1990, Benson et al. 2000, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und ihre Position im Herkunfts-Gen ermittelt. Die erhaltenen Sequenzen wurden entweder mit dem „BCM Search Launcher“ (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/alignment.html>) oder dem ARB-Programm miteinander verglichen.

3.3.12 Stammbaumberechnung

Die phylogenetischen Untersuchungen wurden mit dem ARB-Programm durchgeführt (www.arb-home.de). Die Stammbaumerrechnung erfolgte mit der „Neighbor-Joining“-Methode mit der „Jukes-Cantor“-Korrektur. Dafür wurden die nächst ähnlichen Bakterien- und Archae-Sequenzen, sowie die Sequenzen von beschriebenen mikrobiellen Schwammsymbionten aus den Datenbankrecherchen zum Vergleich mit in die Stammbäume eingerechnet. Zunächst wurden die Bäume mit 16S rRNA Sequenzen >1400 Basen gerechnet und anschließend wurden die kürzeren Sequenzen mit der „Parsimony Interactive-Methode“ (ARB) hinzugefügt.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleichende histologische Untersuchungen zu mikrobiellen Endo- und Epibionten verschiedener Schwammarten

4.1.1 Besiedlung der Schwammoberfläche

Bei der Untersuchung der Schwammoberfläche zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Kalk- und den Kieselschwämmen. Schon mit bloßem Auge oder einer Lupe erkannte man die dicht bewachsenen Nadeln und Oberflächen der Kalkschwämme *Leuconia aspera* und *Sycon raphanus* (Abb. 4.1 a). Auch einige der untersuchten Demospongiae besaßen Epibionten: z.B. *Axinella verrucosa* die Seeanemone *Parazoanthus axinellae* (Abb. 4.2 b) oder *Ircinia fasciculata* verschiedene aufsitzende Algen. Jedoch war ihre Oberfläche nicht annähernd so flächendeckend bewachsen, wie bei den untersuchten Kalkschwämme. Bei der Betrachtung der Schwammoberfläche bei stärkerer Vergrößerung mit dem Rasterelektronenmikroskop, waren *Sycon raphanus* und *Leuconia aspera* besonders dicht mit verschiedenen Diatomeen, unter anderem *Mastogloia sp.* bewachsen (Abb. 4.1 c). *Leuconia aspera* besaß auf seiner Oberfläche ein dichtes mikrobielles Netzwerk, das vereinzelt phialidenartige (sporenbildende Zellen von Pilzen) Strukturen aufwies (Abb. 4.1 d). Eine genaue Bestimmung war aber aufgrund der reinen Oberflächendarstellung der rasterelektronenmikroskopischen Präparate nicht möglich. Dieser Mikroorganismus scheint aber einige ebenfalls auf der Schwammoberfläche vorkommende Diatomeen zu parasitieren, indem er die Diatomeen durch Poren in deren Gürtelbändern befällt (Abb. 4.1 c). Neben den filamentösen Mikroorganismen waren auch verschiedene einzellige Bakterien auf den Diatomeen und Skelettnadeln zu erkennen. Die Oberflächen von *Axinella damicornis*, *Axinella verrucosa*, *Agelas oroides*, *Petrosia ficiformis*, *Chondrosia reniformis*, *Oscarella lobularis* und *Hamigera hamigera* waren im Vergleich dazu sehr sauber, sie wirkten teils sogar axenisch (Abb. 4.1 e-f). Einige Bakterien befanden sich auf der Oberfläche von *Haliclona valliculata* und *Ircinia fasciculata*, die aber keinen ausgeprägten mikrobiellen Film bildeten.

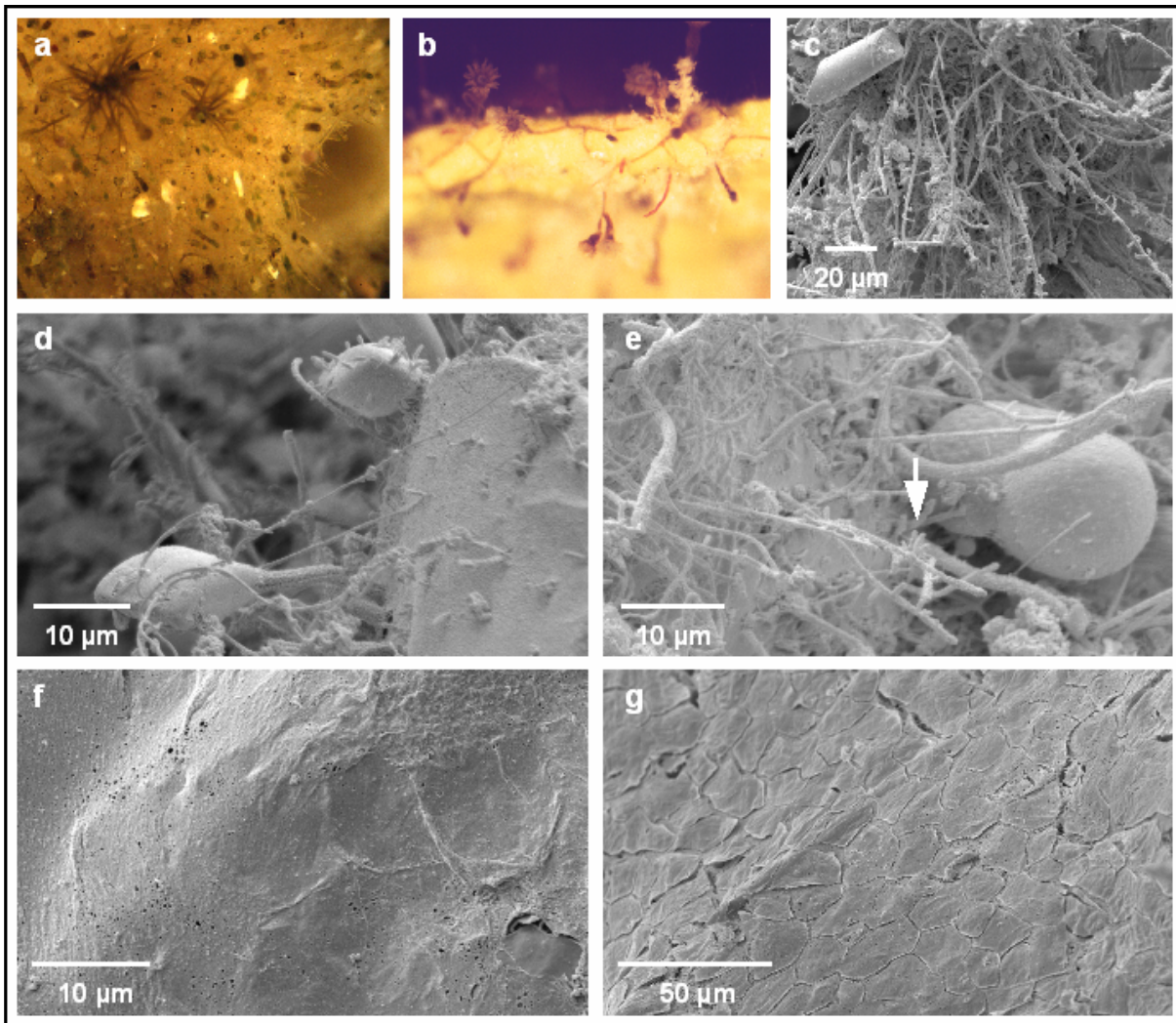


Abb. 4.1: Oberflächenbesiedlung verschiedener Schwammspezies. a: *Leuconia aspera* ist von einer Vielzahl an verschiedenen Algen bewachsen; b: *Axinella verrucosa* mit dem Epibionten *Parazoanthus axinellae*; c-e: die Oberfläche und die Spiculae von *Leuconia aspera* zeigen ein dichtes mikrobielles Geflecht und die Besiedlung mit verschiedenen Diatomeen, die wiederum von Bakterien bewachsen werden (d); e: sporenbildende Strukturen des mikrobiellen Netzes (Pfeil); axenische Oberfläche von *Chondrosia reniformis* (f) und *Axinella damicornis* (g). (a-b: LM, c-g: REM)

4.1.2 Besiedlung des Schwammgewebes

Im Schwammgewebe konnte weder mit der pilzspezifischen Silberfärbung nach Gomori, der Fluoreszenzmarkierung mit Calcofluor White, noch mit der Übersichtsfärbung mit Toluidin Blau Pilze im Schwammgewebe nachgewiesen werden. Auch bei den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen gab es keine Hinweise auf pilzliche Zellen. Durch die kontrastreichen Färbungen mit Calcofluor White

und der Silberfärbung nach Gomori konnten auch dickere Gewebeschnitte, wie die 100µm dicken Vibratomschnitte und Handschnitte gefärbt und gut ausgewertet werden, so dass auch große Bereiche des Gewebes systematisch untersucht werden konnten. Im Gewebe ließen sich nur vereinzelt Konidien finden, die sich terrestrischen Pilzgruppen zuordnen lassen (Abb. 4.2 a-b).

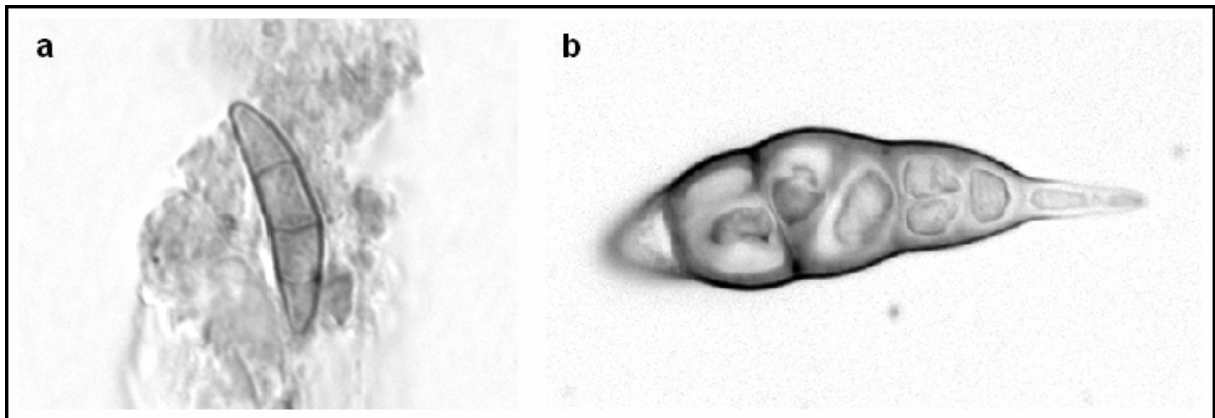


Abb. 4.2: Konidien im Schwammgewebe von *Axinella verrucosa* (LM).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Bakterien im Gewebe der Schwämme zeigten einerseits Bakterientypen, die in verschiedenen der untersuchten Schwammarten auftraten und andererseits Bakterien, die nur in bestimmten Schwämmen zu finden waren.

Clathrina clathrus

Im Gewebe des Kalkschwammes *Clathrina clathrus* dominierte ganz deutlich ein spirillenförmiges Bakterium. Die Zellen hatten einen Durchmesser von 0,9µm und waren etwa 4µm lang. Man erkannte deutlich die Zytoplasmamembran und eine weitere äußere Membran, wie sie für Gram negative Bakterien typisch ist (Abb. 4.3 a). Das Bakterium trat im gesamten Mesohyl auf und dies teilweise in großer Dichte (Abb. 4.3 b). Dieser Bakterientyp wurde in keinem der anderen untersuchten Schwämme gefunden.

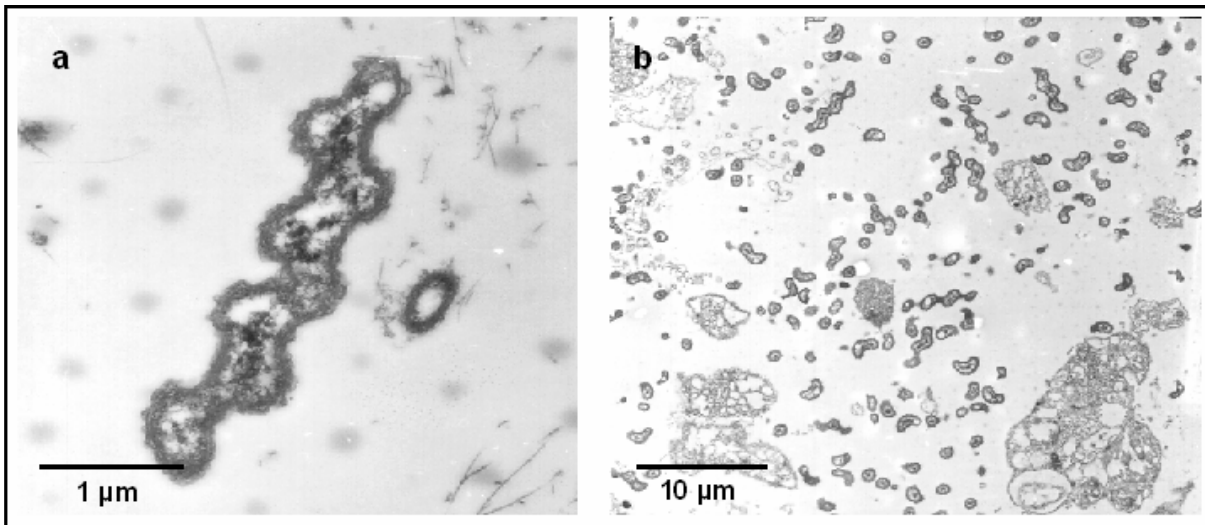


Abb. 4.3: Spirillenförmiges Bakterium im Mesohyl von *Clathrina clathrus* (TEM).

Chondrosia reniformis

Der skelettfreie Nierenschwamm *Chondrosia reniformis* besteht aus einem hellen zentralen Bereich, dem Choanosom mit den Kragengeißelkammern und einem dunklen, durch sehr dichte kollagene Fasern geprägten Cortex (van Soest et al. 2000). Die meisten Bakterien der untersuchten Schwämme befanden sich im Bereich der Kragengeißelkammern, sie lagen dort z.T. in unmittelbarer Nähe zu den Choanocyten (Abb. 4.4 a). Es ließen sich bei den hier untersuchten Individuen hauptsächlich vier verschiedene Morphotypen unterscheiden, Typ A war oval mit einem Durchmesser von 0,8-0,9µm. Die Zellen waren von einer ungleichmäßig geformten Schleimkapsel umgeben (Abb.4.4 b). Ein weiterer Morphotyp (Typ B) war oval bis stäbchenförmig mit einer teilweise etwas ungleichmäßigen Oberfläche. Er hatte einen Durchmesser von 0,8-1,1µm und ein relativ einheitliches Zytoplasma. Typ C (Durchmesser 0,7µm) hatte ein deutlich stärker pigmentiertes äußeres Zytoplasma (Abb.4.4 b). Ein Bakterientyp besaß ein stärker pigmentiertes zentrales Zytoplasma im Vergleich zum äußeren und einen Durchmesser von 0,7-0,8µm (Typ D). Die Bakterien im Mesohyl waren physiologisch aktiv, da sie sich noch im Schwammgewebe teilten (Abb. 4.4 c). Sie wurden auch von den Zellen des Mesohyls phagozytiert und dienten somit direkt als Nahrung (Abb. 4.4 d). Demgegenüber fand man im sehr dicht mit kollagenen Fasern gefüllten Cortex von *Chondrosia reniformis* nur vereinzelt Bakterien (Abb. 4.4 e-f), wobei es sich dabei um die gleichen Morphotypen wie im Bereich der Choanosomen handelte.

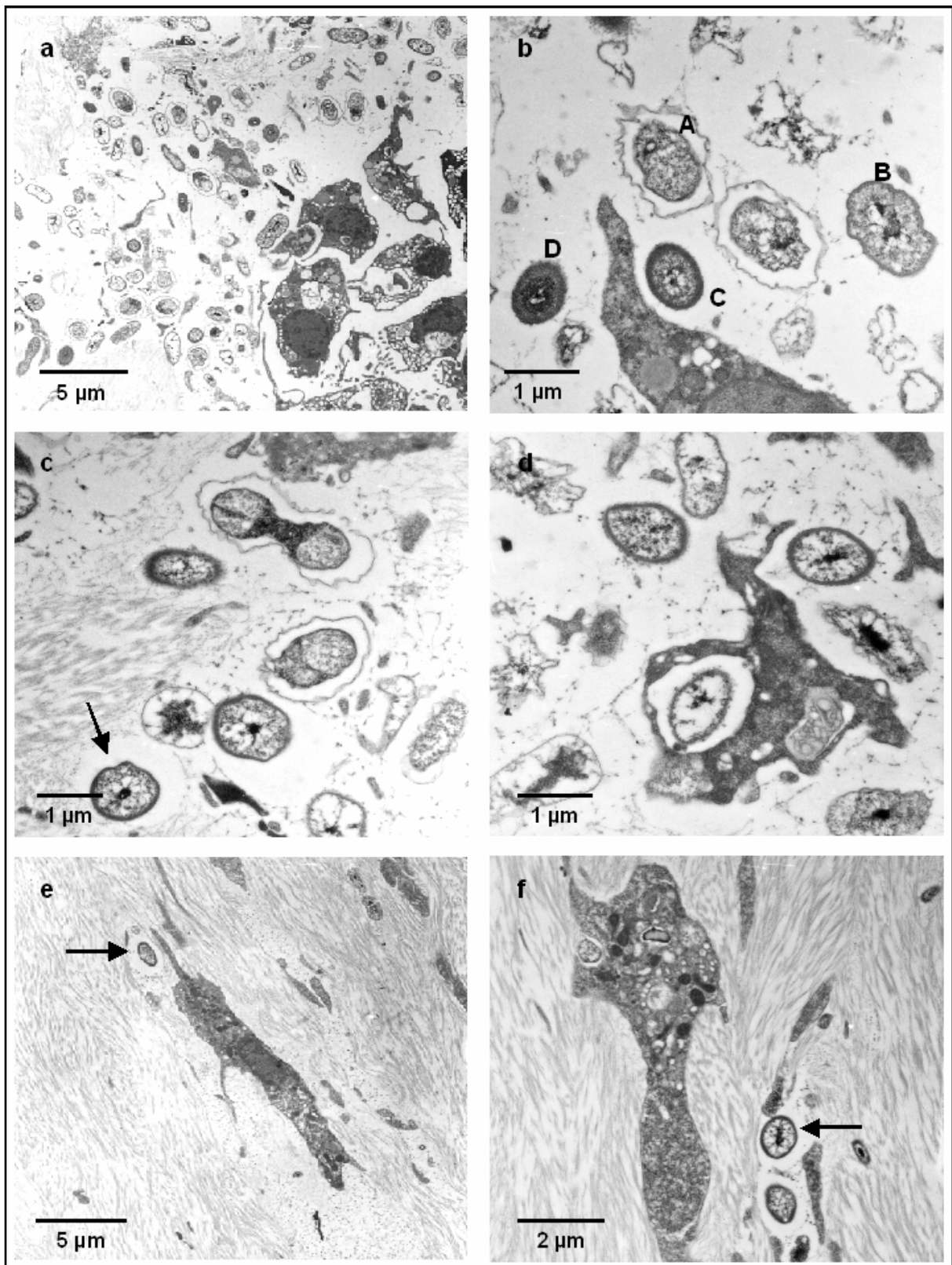


Abb. 4.4: *Chondrosia reniformis*: a: Bakterien im Bereich des Choanosoms; b-d: verschiedene bakterielle Morphotypen im Mesohyl; e-f: vereinzelte Bakterien im Cortex des Schwammes. Pfeil: kollagenfreier Hof um die Bakterien (TEM).

Auffällig waren die deutlichen kollagenfreien Bereiche um die Bakterien, die sowohl im Cortex (Abb. 4.4 e-f), als auch im Übergangsbereich vom Choanosom zum Cortex zu finden waren (Abb. 4.4 c) und durch das Auflösen der kollagenen Fasern durch die Bakterien entstanden.

Agelas oroides

Im Mesohyl von *Agelas oroides* waren ebenfalls verschiedene Bakterienmorphotypen zu finden. Neben Bakterien des Typs B, gab es einen ähnlichen Typ, der aber durchgehend einen größeren Durchmesser von ca. 1,8µm besaß (Typ E).

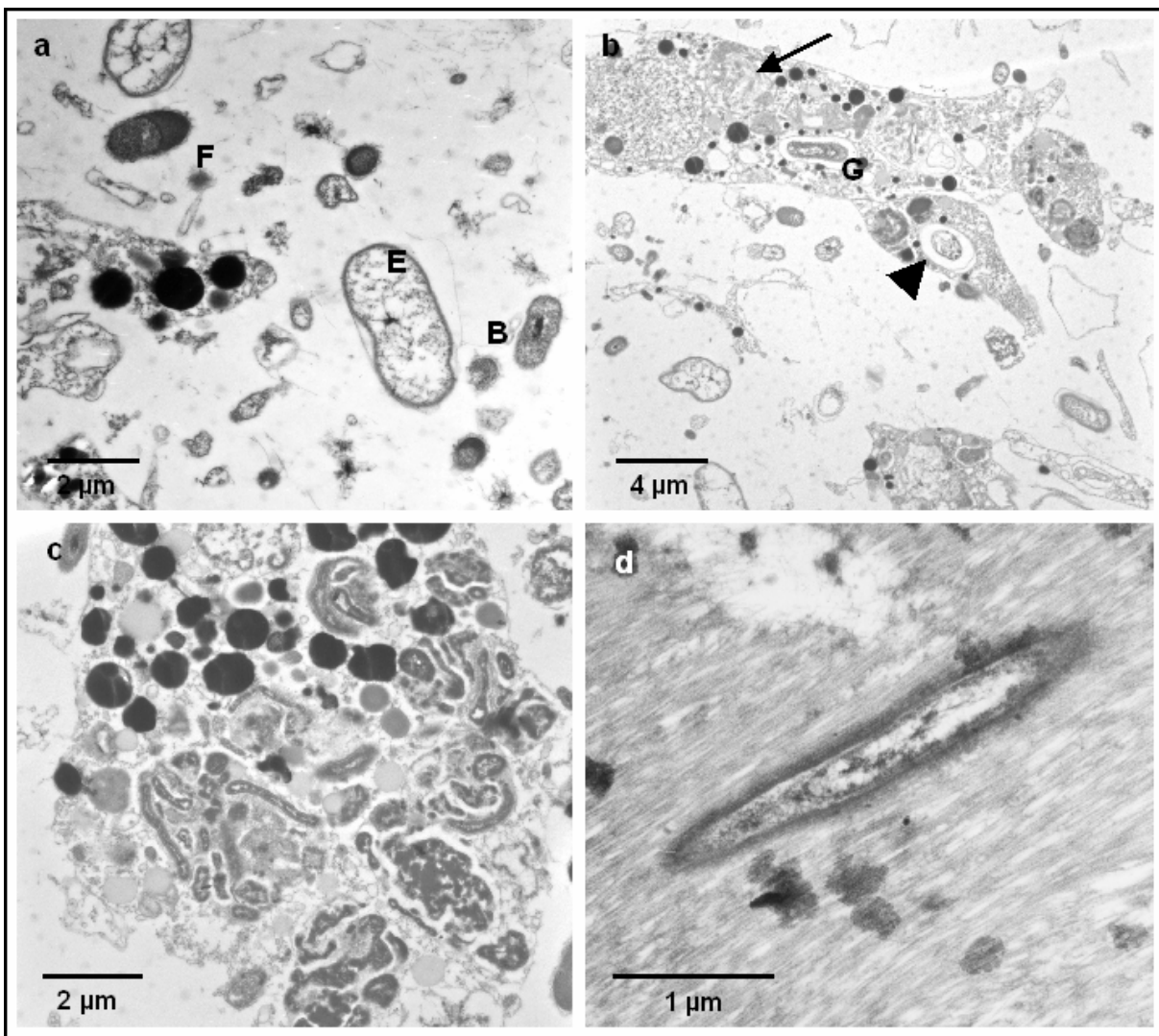


Abb. 4.5: *Agelas oroides*: a: verschiedene Bakterientypen im Mesohyl; b: Schwammzelle mit Nahrungsvakuolen (Pfeilspitze) und Bakterienvakuolen (Pfeil); c: intrazelluläre Vakuole mit einheitlichem Bakterientyp, der nicht im Mesohyl auftritt; d: Bakterium im Spongjin (TEM).

Ein weiterer Bakterientyp (Typ F), mit einem Durchmesser von 1-1,2µm zeigte ein zentrales helleres und äußeres dunkleres Zytoplasma (Abb. 4.5 a). Typ G hatte einen Durchmesser von 0,7µm und besaß intrazelluläre Vesikel und eine wellenförmige äußere Membran (Abb. 4.5 b). Neben den Nahrungsvakuolen mit einzelnen Bakterien aber ansonsten leerem Lumen (Pfeilspitze Abb. 4.5 b), wie in allen der untersuchten Schwammspezies, besaßen einige Zellen von *A. oroides* weitere mit Bakterien gefüllte Vakuolen (Abb. 4.5 b-c). Die Bakterien in den Vakuolen unterschieden sich deutlich von denen im Mesohyl. Sie besaßen einen Durchmesser von etwa 0,3µm und waren bis zu achtmal so lang wie breit. Sie lagen zum Teil gebogen in den zusätzlich mit einer Matrix gefüllten Vakuolen.

Im Spongium von *A. oroides* kamen längliche, etwa 0,5µm breite Bakterien vor, die nicht im Mesohyl zu finden waren. Sie waren filamentbildend und durchwuchsen das Spongium indem sie es wahrscheinlich auflösten (Abb. 4.5 d).

Ircinia fasciculata

Ircinia fasciculata beherbergte viele Bakterien und ebenfalls verschiedene Bakterientypen, die sich frei im interzellularen Raum befanden. So ähnelten einige Bakterien den Morphotypen A und B aus *Chondrosia reniformis*. Ein weiterer Typ (H) besaß ein stärker granuliertes zentrales Zytoplasma im Vergleich zum äußeren (Abb. 4.6 a). *I. fasciculata* hatte phototrophe Endobionten im Mesohyl, deren spiralförmige Thylakoide man deutlich erkennen konnte (Typ J). Die Bakterien des Mesohyls wurden bei *I. fasciculata* ebenfalls von den Schwammzellen phagozytiert auch der Typ A mit einer Schleimkapsel (Abb. 4.6 b).

Spirastrella cunctatrix

Im Mesohyl von *Spirastrella cunctatrix* ließen sich die Bakterienmorphotypen A, B, C und G nachweisen (Abb. 4.6 c-d). Weder im Spongium, noch in spezielle Bakterienvakuolen waren Bakterien wie bei *Agelas oroides* zu finden.

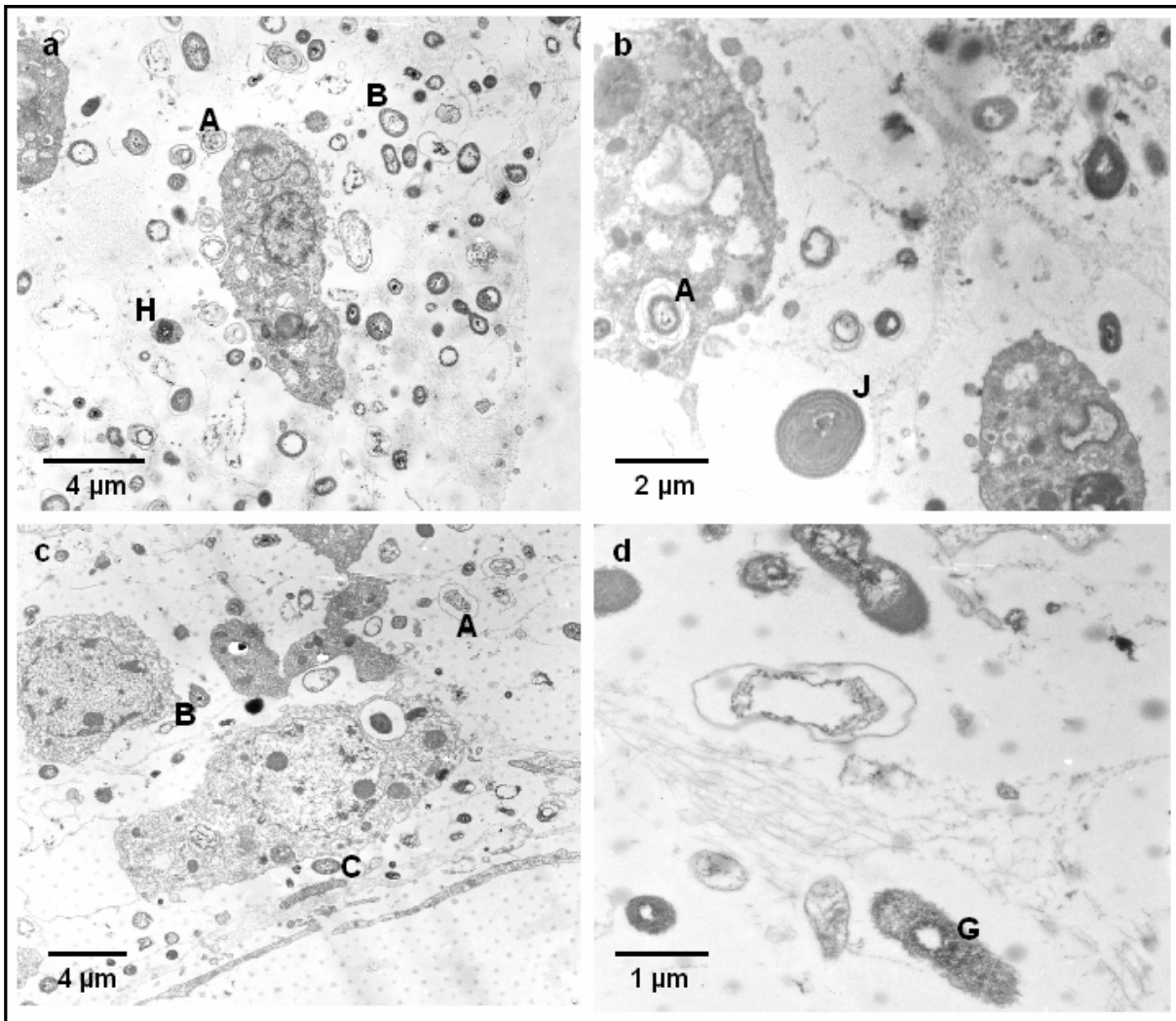


Abb.: 4.6: a-b: *Ircinia fasciculata*: verschiedene Bakterientypen im Mesohyl; b: Bakterientyp A mit Schleimkapsel in einer Nahrungsvakuole einer Mesohylzelle; c-d: *Spirastrella cunctatrix*: Bakterien im Mesohyl (TEM).

Acanthella acuta

Im Mesohyl von *Acanthella acuta* waren nur relativ wenige Bakterien. In einigen Zellen des Mesohyls konnte man intrazelluläre Vakuolen mit Bakterien finden, die denen von *Agelas oroides* ähnelten (Abb. 4.7 a). Im Sponginskelett waren filamentbildende Bakterien mit einer intrazytoplasmatischen Membran (Abb. 4.7 b-c).

Anchinoe tenacior

Anchinoe tenacior besitzt ebenfalls nur relativ wenige Bakterien im Mesohyl. Der Schwamm wurde auch von filamentbildenden Bakterien im Spongins besiedelt. Diese

besaßen eine intrazytoplasmatische Membran, die deutlich ein inneres und äußeres Zytoplasma voneinander trennte (Abb. 4.7 d-f).

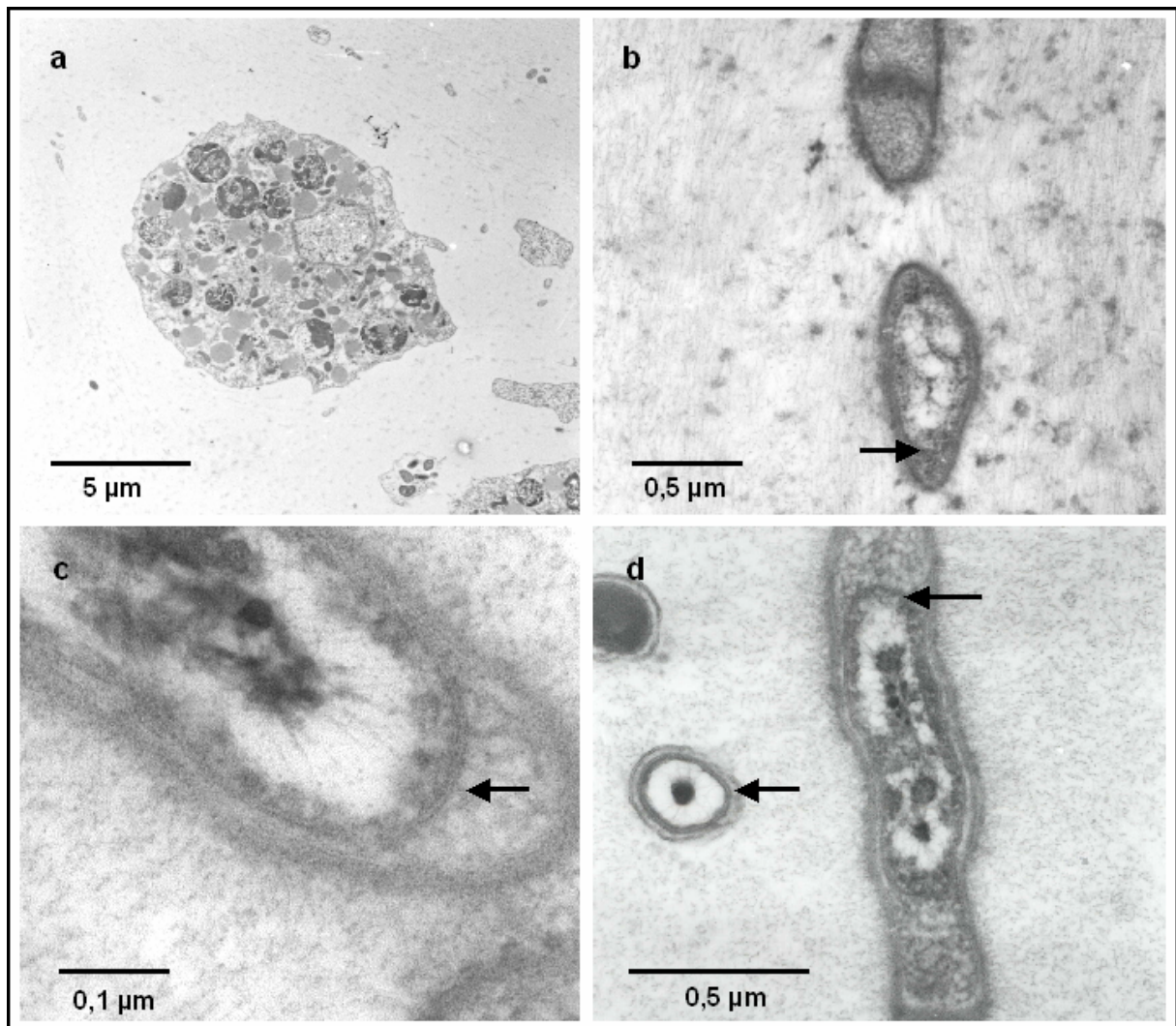


Abb. 4.7: a-b: *Acanthella acuta*; a: Bakterienvakuolen in Zelle des Mesohyls; b: Bakterium im Spongin (Pfeil: Intrazytoplasmatische Membran); c-d: *Anchinoe tenacior*. die Bakterien im Spongin besitzen eine Membran, die einen zentralen Zellbereich abtrennt (Pfeil, TEM).

Im Gewebe einiger Schwammarten waren regelmäßig Schalen von Dinoflagellaten zu finden. So traten *Ceratium furca* und *Ceratium tritops* in *Haliclona valliculata*, sowie *Ceratium fusus* und *Prorocentrum sp.* in *Aplysina cavernicola* auf. Da die Dinoflagellaten deutlich zu lang und zu breit sind, um durch die wasserführenden Kanäle aufgenommen worden zu sein, muss der Schwamm sie mit seinem Gewebe umwachsen haben (Abb. 4.8).

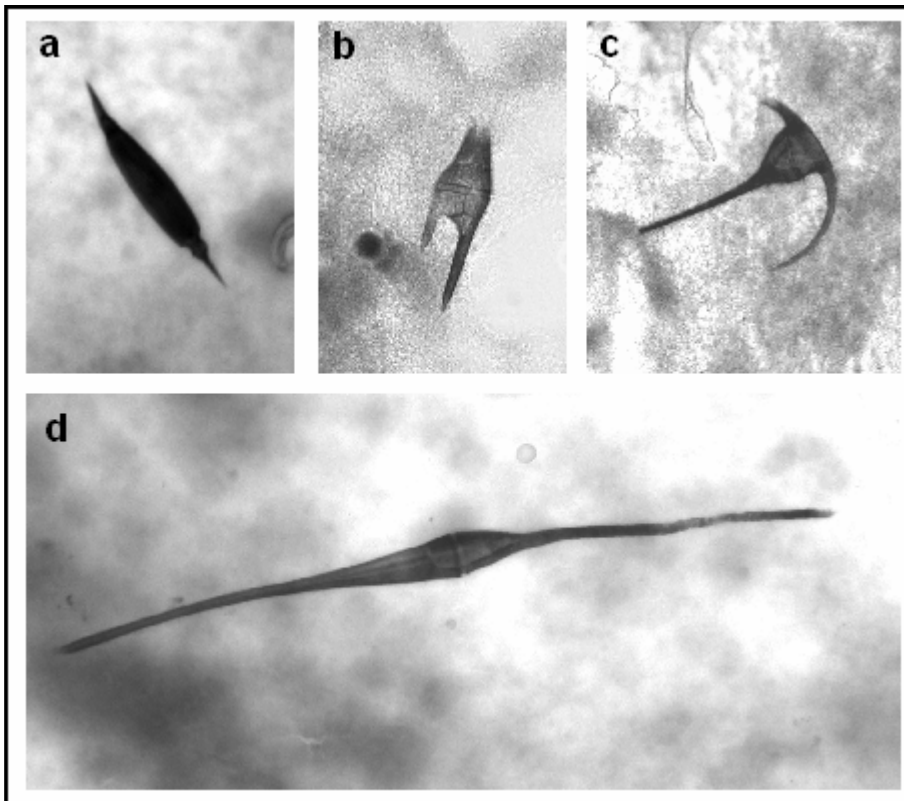


Abb. 4.8: Dinoflagellaten im Schwammgewebe: *Prorocentrum* sp. (a) und *Ceratium fusus* (d) im Schwamm *Aplysina cavernicola* und *Ceratium furca* (b) und *Ceratium tripos* (c) im Gewebe von *Haliclona valliculata* (LM).

4.2 Bakterielle Endobionten in *Axinella verrucosa*

Axinella verrucosa besaß ein sehr locker strukturiertes Mesohyl mit nur einem Bakterienmorphotypen. Dieser war oval bis stäbchenförmig mit einem Durchmesser von $0,3\mu\text{m}$ und in recht geringer Anzahl ausschließlich an den kollagenen Fasern des Interzellularraumes zu finden (Abb. 4.9 a-b). Auch im Bereich der Kragengeißelkammern kam es zu keiner erhöhten Konzentration der Bakterien. Im Mesohyl des Schwammes waren regelmäßig „spherulous cells“ zu finden, die mit großen runden Vakuolen gefüllt waren, die annähernd die gesamte Zelle ausfüllten (Abb. 4.9 c). Im Zentrum der mit Granula gefüllten Vakuolen befanden sich parallel angeordnete filamentöse Strukturen (Abb. 4.9 d).

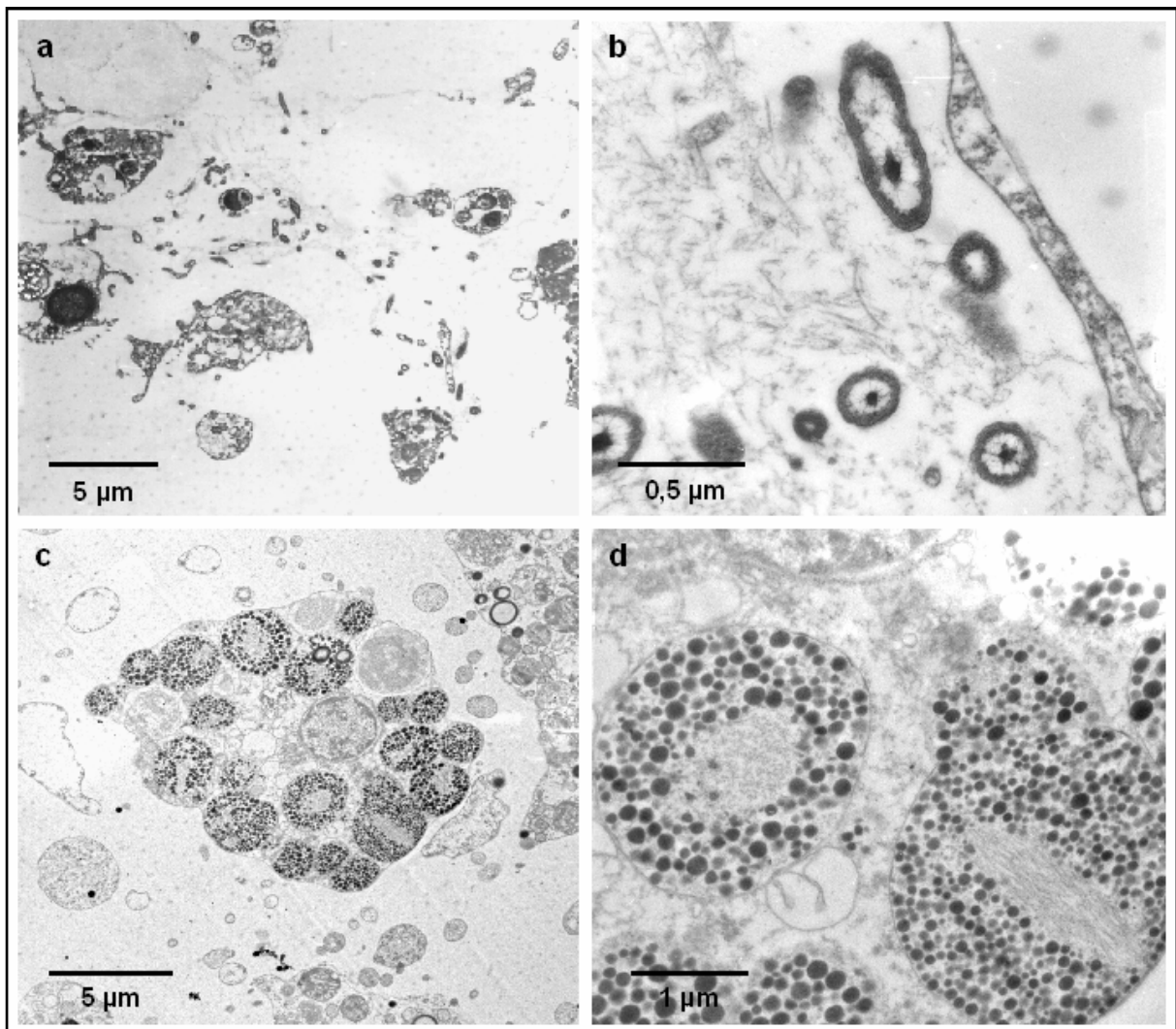


Abb. 4.9: *Axinella verrucosa*: a-b: Bakterien im Mesohyl; c: „Kugelige Zelle“ (spherulous cells) im Schwammgewebe; d: Vakuolen der „spherulous cells“ mit parallel angeordnetem filamentösem Material (TEM).

4.2.1 Fadenförmige Mikroorganismen im Spongin

Im Spongin von *A. verrucosa* wurden filamentbildende Bakterien nachgewiesen, die nicht im Mesohyl vorkamen. Ihr Durchmesser lag zwischen 0,4 und 1µm, wobei die dickeren Zellen kürzer als die dünneren waren (Abb. 4.10). Einige der schmalen Filamente besaßen sporenartige Gebilde (Abb. 4.10 d, f). Man erkannte das Myzel teilweise schon bei einer schwachen Vergrößerung in Schwammanschnitten, da es eine dunkle Eigenfärbung besaß (Abb. 4.11 b-c). Die Zellen ließen sich mit der Gomori-Silberfärbung markieren, wobei man deutlich die einzelnen Zellen und die Verzweigung des Myzels erkennen konnte. Es breitete sich im gesamten Spongin um

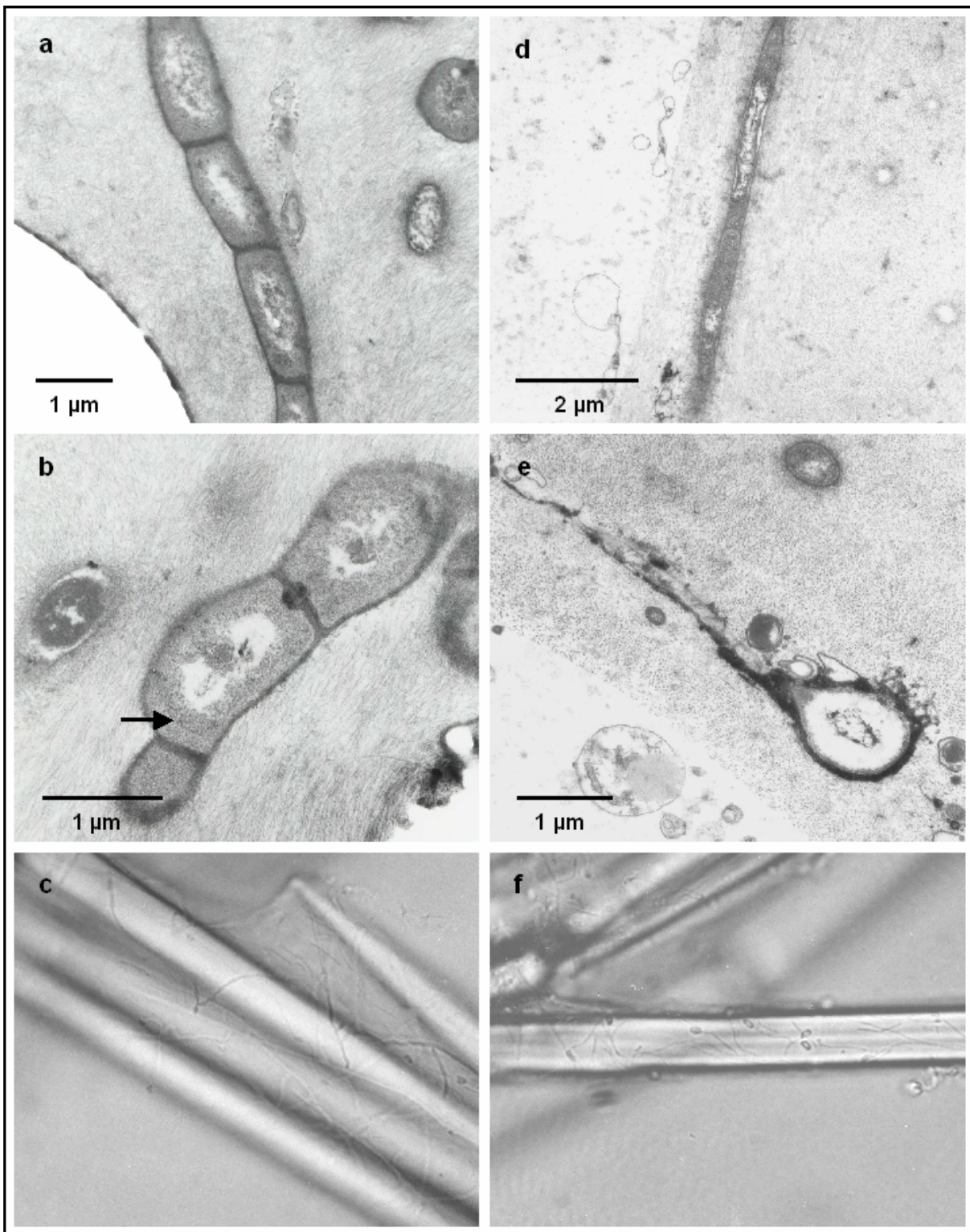


Abb. 4.10: *Axinella verrucosa*: a-c: breiter Bakterientyp der filamentbildenden Bakterien im Spongin; d-f: schmaler Bakterientyp mit sporeartigen Strukturen, Pfeil: Intrazytoplasmatische Membran (a-b, d-e: TEM; c, f: LM).

die zentral liegenden Skelettnadeln aus (Abb. 4.11f-g, Abb. 4.12). Das Myzel war sehr formvariabel, neben der unterschiedlichen Breite waren die Zellen einerseits

perlschnurartig aufgereiht und andererseits erkannte man im rasterelektronenmikroskopischen Präparat nur ein einheitliches Filament ohne einzelne Zellen unterscheiden zu können (Abb. 4.12 b, c, f). Die Schwämme wurden offensichtlich nicht durch das Myzel geschädigt. Es gab keine abgestorbenen Bereiche der besiedelten Individuen. Sie besaßen eine intakte Oberfläche und das Gewebe war normal strukturiert, ohne zellfreie oder degradierte Bereiche im Mesohyl oder den Kragengeißelkammern (Abb. 4.11a, d-e).

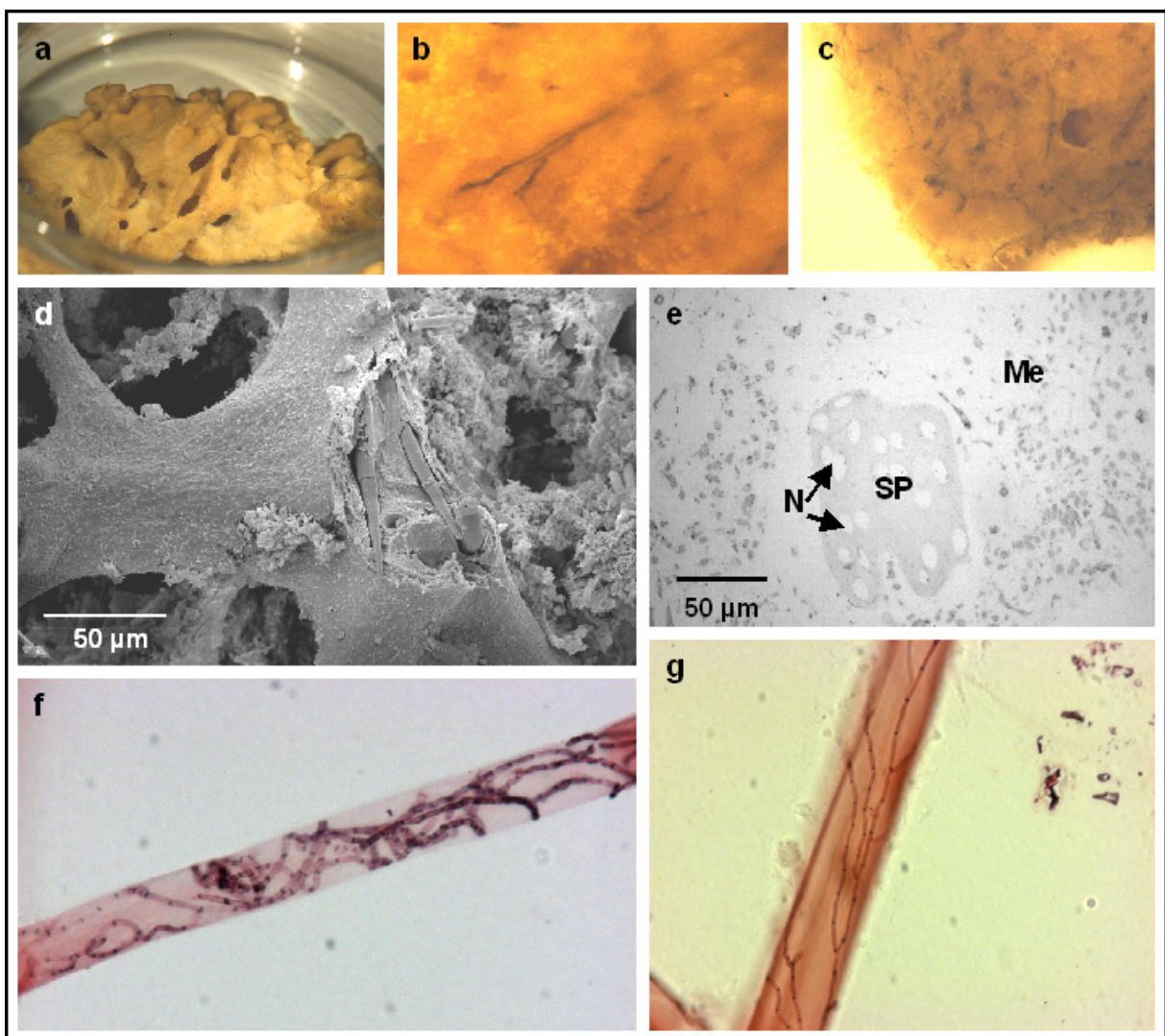


Abb. 4.11: *Axinella* sp: a: Schwamm nach der Probennahme; b-c: dunkel pigmentiertes mikrobielles Geflecht im Schwammgewebe; d: Spongin mit zentral liegenden Spiculae; e: Aufbau des Mesohyls; f-g: filamentbildendes Bakterium in isolierten Sponginfasern nach der Markierung mit der Gomori-Silberfärbung. Me: Mesohyl, N: Spiculae, Sp: Spongin (a-c, e, f-g: LM; d: REM).

Auch das Spongium selber wurde durch die Bakterien nicht geschädigt, es behielt seine feste Struktur mit dicht gepackten kollagenen Fasern, sowie seine Elastizität (Abb. 4.10a-d). Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die kollagenen Fasern des Spongins aufgelöst und nicht von den Bakterien zum Durchwachsen auseinandergeschoben wurden.

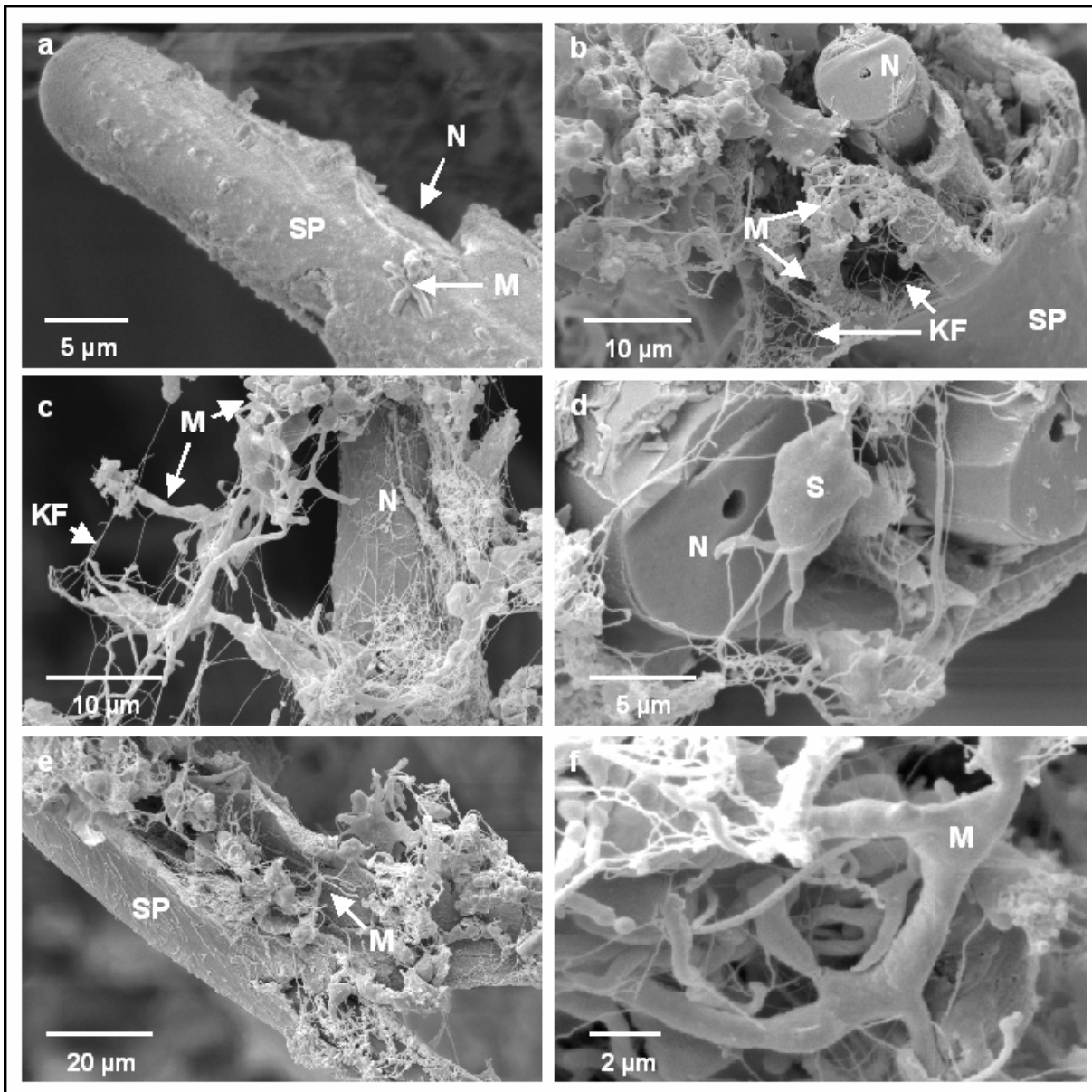


Abb. 4.12: *Axinella verrucosa*: a: intaktes Spongiumfilament mit heraustretendem mikrobiellen Myzel; b-f: aufgebrochenes Spongium mit freigelegten filamentbildenden Bakterien, die auch sporeartige Strukturen ausbilden (d); das mikrobiellen Myzel zeigt einheitliche Filamente (f) und perlschnurartige Bakterienketten (b); KF: kollagene Fasern, M: filamentbildende Bakterien. N: Spiculae, S: sporeartige Struktur, Sp: Spongium; (REM).

Es gab keine leeren Gänge im Spongin, die nach dem Durchwachsen der Bakterien zurückblieben. Ein auffälliges Merkmal der Bakterien im Spongin war eine intrazelluläre Membran. Sie trennte das Zytoplasma der Bakterien in zwei Bereiche, wobei eine kernartige Struktur im Zentrum der Zellen entstand, in der sich auch die DNA befand (Abb. 4.10 b). Dieses Merkmal zeigten die bakteriellen Myzelien im Spongin sowohl von *Axinella verrucosa*, *A. damicornis*, *Anchinoe tenacior*, *Acanthella acuta* und *Agelas oroides*. Die *Axinella verrucosa*-Proben von Giglio, als auch aus dem Atlantik vor Roscoff wiesen die gleichen Bakterien auf. Dies zeigte, dass es sich hierbei nicht nur um ein regionales Phänomen der Schwammpopulationen um Elba handelte.

4.2.2 Bakterien in intrazellulären Vakuolen

Einige Schwammzellen besaßen mit Bakterien gefüllte Vakuolen, wie sie auch bei *Agelas oroides* und *Acanthella acuta* zu finden waren. Diese enthielten neben einem einheitlichen Bakterientyp zum Teil noch weitere membranumrandete Strukturen (Abb. 4.13 c). In der Nachbarschaft der Vakuolen befanden sich oft weitere Vakuolen mit stark lichtbrechendem Inhalt, der bei der Präparation zum Teil herausgelöst wurde (Abb. 4.13 a). Die Bakterienvakuolen besaßen meist mehrere begrenzende Membranen - bei den untersuchten Spezies waren es bis zu vier (Abb. 4.13 d). Die Vakuolen kamen in Zellen verschiedener Größe vor, die offensichtlich von anderen Zellen gleichen Typs als ganzes phagozytiert wurden (Abb. 4.13a). Große Zellen mit fingerartiger Oberflächenvergrößerung besaßen viele Bakterienvakuolen (Abb. 4.13 b). Dabei handelte es sich um frühe Oocyten (persönliche Mitteilung Prof. Sciscioli, Universität Bari). Die Bakterienvakuolen wurden regelmäßig sowohl in den untersuchten *A. verrucosa* Spezies von den mediterranen als auch vom atlantischen Untersuchungsgebiet gefunden.

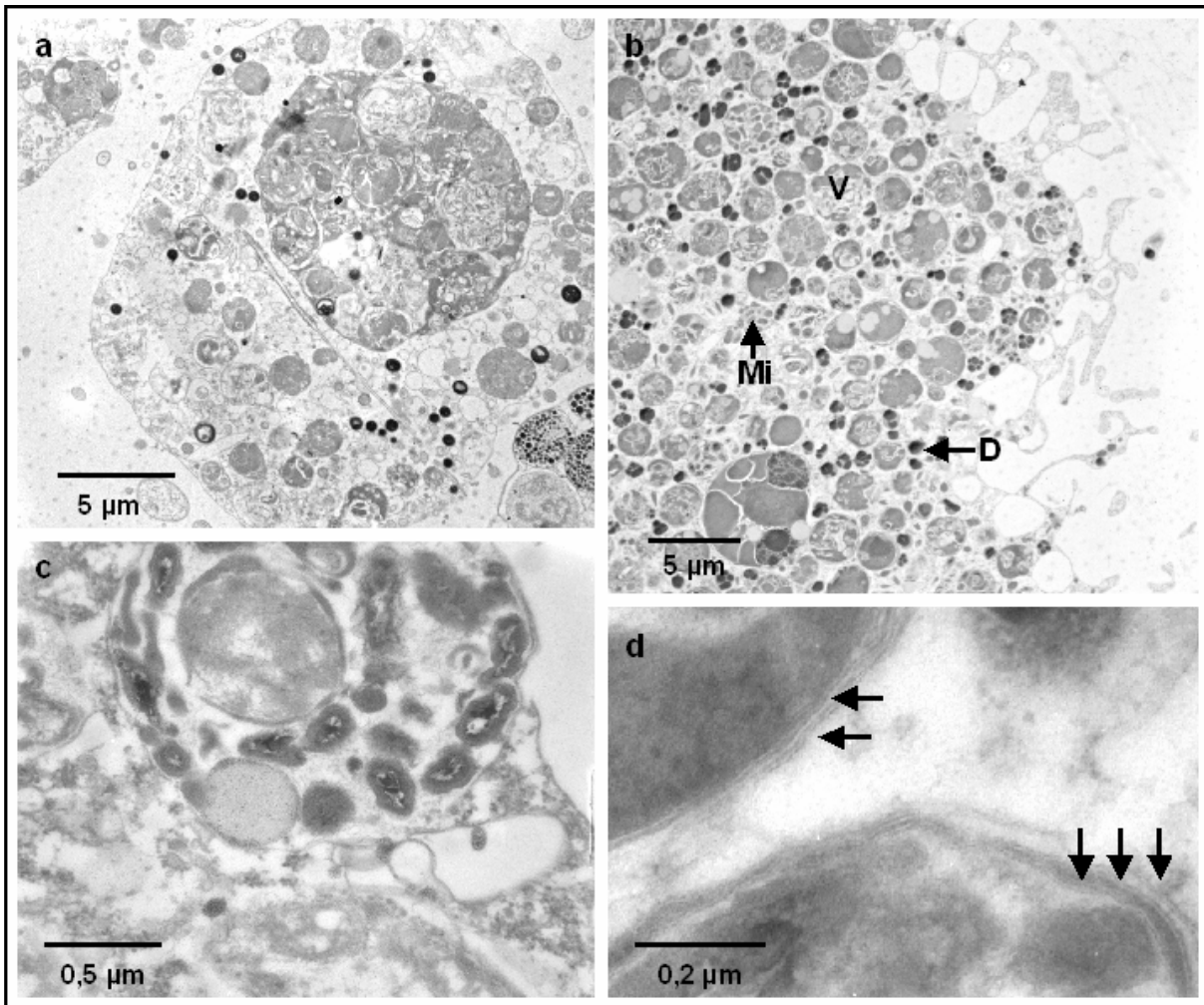


Abb. 4.13: *Axinella verrucosa*: a: Schwammzelle im Mesohyl mit vielen Bakterienvakuolen, die eine weitere Zelle phagocytiert hat; b: frühe Oocyte mit vielen Bakterienvakuolen und Dottersubstanzen; c: Bakterienvakuole mit weiteren Membraniumrandeten Strukturen in ihrem Inneren; d: Bakterienvakuolen mit mehreren begrenzenden Membranen (Pfeile). D: Dottersubstanz, Mi: Mitochondrien, V: Bakterienvakuolen (TEM).

4.2.3 Kollagenaseaktivität

Die mikromorphologischen Untersuchungen wiesen auf kollagenolytische Eigenschaften der Sponginbakterien hin. Dies sollte durch einen Kollagenasenachweis überprüft werden. Kathepsin B ist ein extrazellulär wirkendes kollagenolytische Enzym. Diese matrixdegradierende Zysteinprotease lässt sich mit dem Substrat Z-arg-arg-4-methoxy-2-naphthylamide nachweisen. Die Sponginbakterien ließen sich mit dem Ansatz markieren, die Bakterien des Mesohyls oder andere Strukturen im Schwammgewebe wurden nicht gefärbt. Färbekontrollen mit dem Inhibitor (Leupep-

tin) und ohne Substrat waren negativ und zeigten die Spezifität der erhaltenen Markierung. Es wurden nicht alle Bakterienzellen im Spongium gefärbt, so dass sich unterschiedlich enzymatisch aktive Zellen im Myzel darstellen ließen (Abb. 4.14).

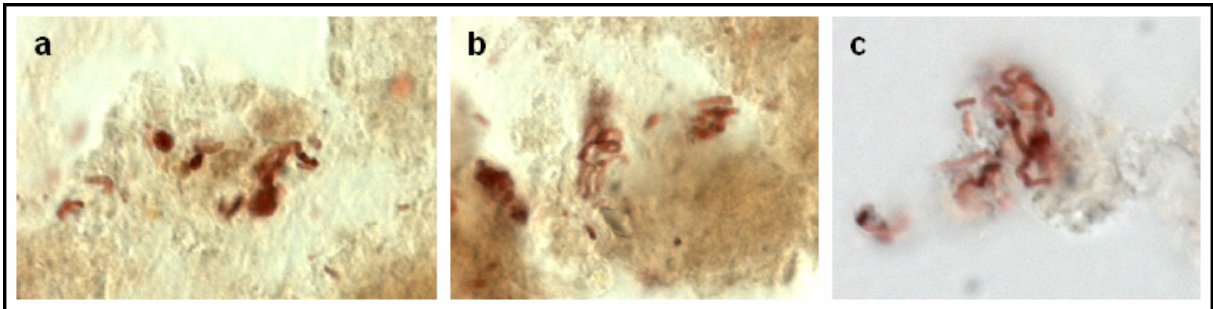


Abb. 4.14: Kathepsin B-Färbung an den filamentbildenden Bakterien des Spongiums von *A. verrucosa* (LM).

4.2.4 Hälterungsexperiment

Das Hälterungsexperiment wurde durchgeführt, um die potentielle Pathogenität der Bakterien im Spongium zu testen. Die Schwämme bekamen keine partikuläre Nahrung mehr und wurden bei einer mindestens 5°C höheren Wassertemperatur als am natürlichen Standort gehalten. Als Reaktion auf die veränderten Lebensbedingungen kam es zu einer Umstrukturierung der Schwammoberfläche von *A. verrucosa*. Die histologischen Untersuchungen des Schwammgewebes zeigten bei einer Versuchsdauer von sechs Tagen keine wuchsfördernde Auswirkungen auf die Spongiumbakterien. Selbst nach der verlängerten Hälterung von zwei Wochen, auch ohne Belüftung, zeigte das Myzel kein Übergreifen auf andere Teile des Schwamms (Abb. 4.15).

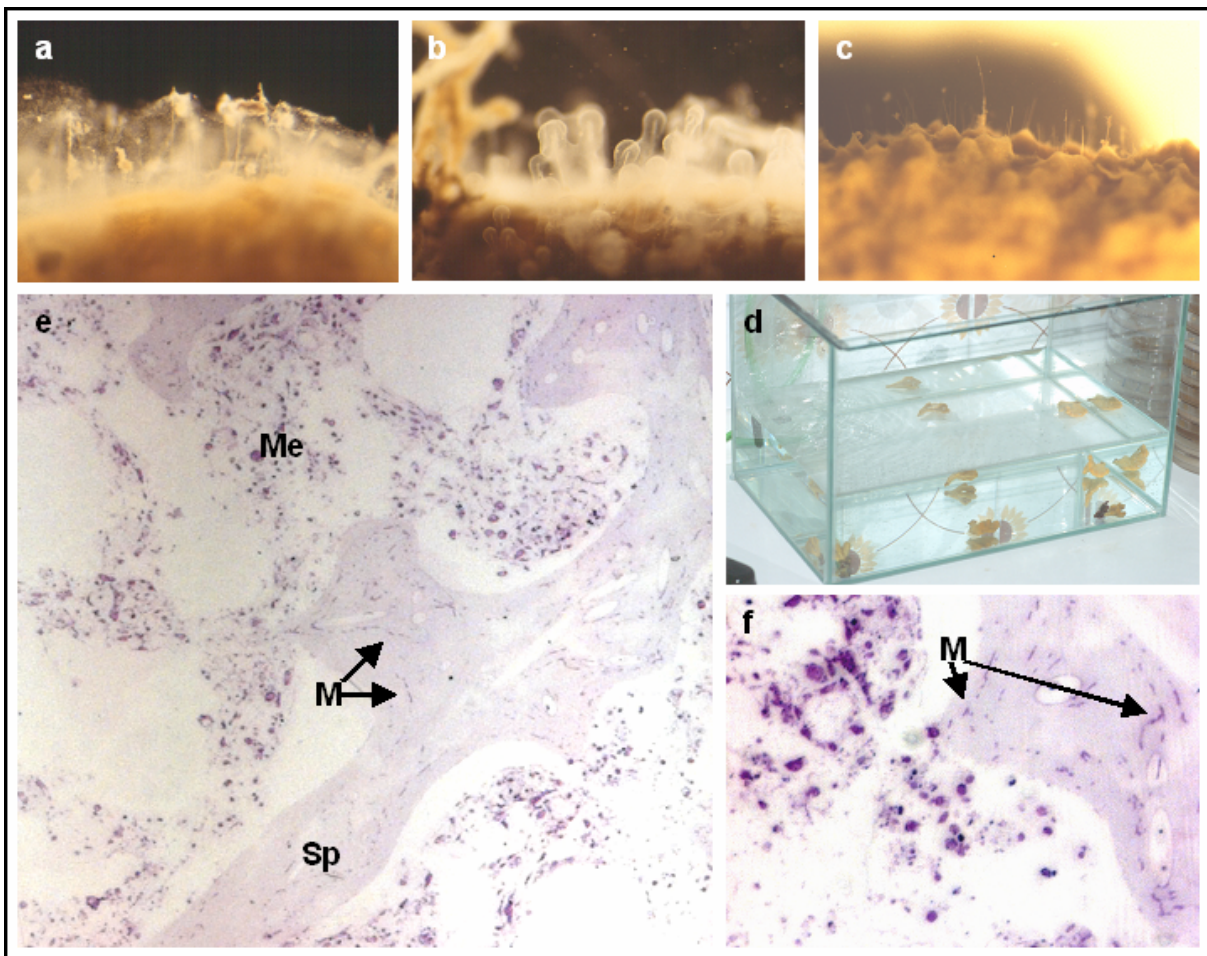


Abb. 4.15: *Axinella verrucosa*: a-b: Umstrukturierung der Schwammoberfläche nach sechstägiger Hälterung in sterilfiltriertem Seewasser; c: Schwammoberfläche direkt nach der Probenahme vom natürlichen Standort; d: Hälterungsansatz; e-f: Aufbau des Mesohyls nach dem Hälterungsansatz; die Präparate zeigen keine Ausweitung des bakteriellen Geflechtes im Spongin oder Übergreifen auf das angrenzende Gewebe (TB-Färbung). M: filamentbildende Bakterien, Me: Mesohyl, Sp: Spongin (a-c, e-f: LM).

4.3 Kultivierte bakterielle Diversität aus *Axinella verrucosa*

Aus den isolierten und kultivierten Bakterien aus dem Schwamm *A. verrucosa* wurde die 16S rRNA zu ihrer Bestimmung extrahiert und mit einer PCR vervielfältigt. Beim Restriktionsverdau zur Charakterisierung der erhaltenen Sequenzen, zeigten sich sieben verschiedene Bandenmuster bei der anschließenden Überprüfung im Agaro-segel. Vertreter aus allen Gruppen mit einem unterschiedlichen Bandenmuster wurden sequenziert. Die erhaltenen Sequenzlängen waren zwischen 596 und 904 Basenpaaren lang, wobei die Sequenzen außer beim Isolat AB10 (596 Basen) immer über 800 Basenpaaren lagen.

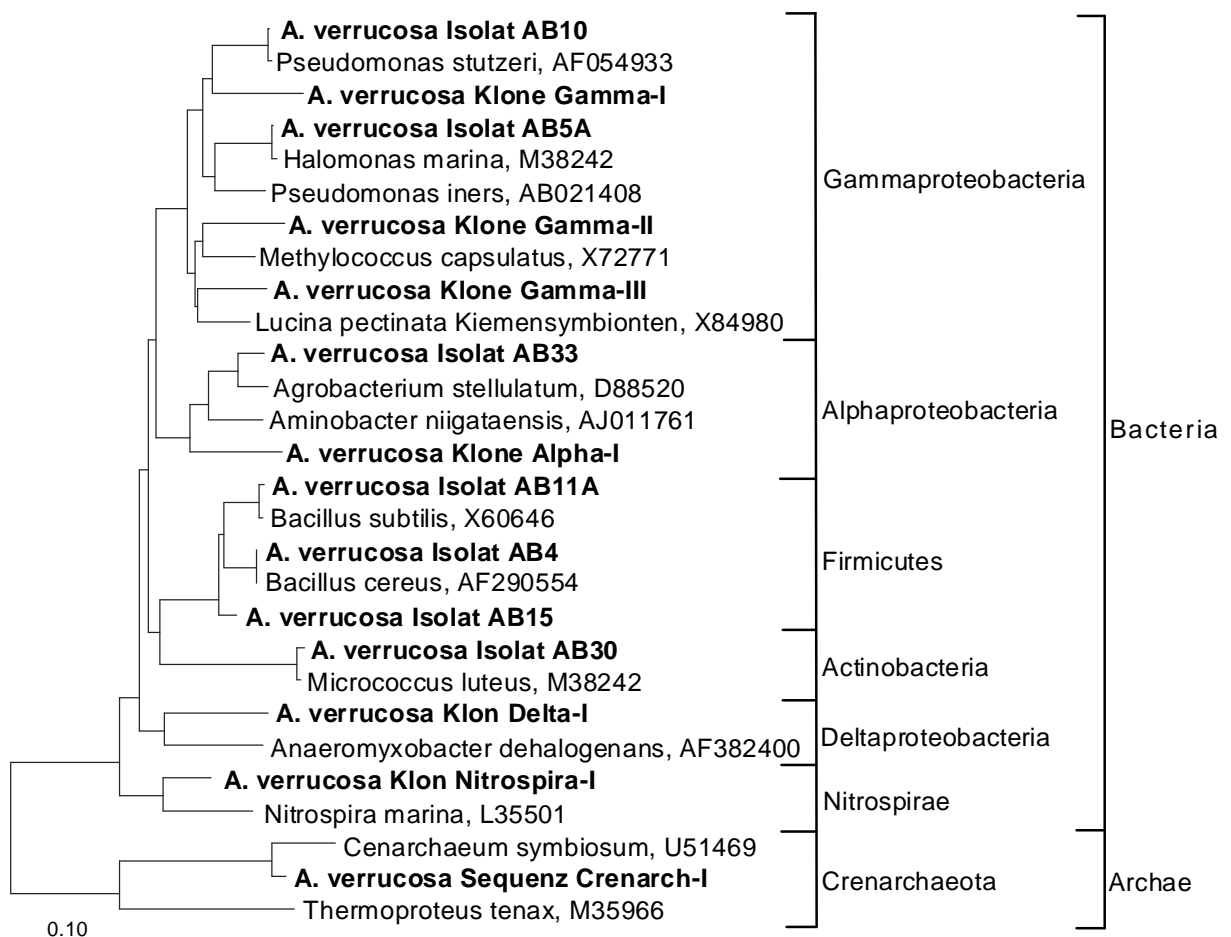


Abb. 4.16: Phylogenetischer Stammbaum der Klonsequenzen und Sequenzen der isolierten Bakterien aus *Axinella verrucosa*. Übersicht zur taxonomischen Eingruppierung aller erhaltenen Sequenzen. Die Berechnung erfolgte aufgrund der 16S rRNA Sequenzen mit „neighbor-joining“ und „parsimony“. Der Maßstrich gibt eine 10%ige Sequenz-Differenz an.

Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit DNA Datenbanken (NCBI BLAST, Ribosomal Database Project II) ergab, dass die isolierten Bakterien zu den vier Bakteriengruppen γ -Proteobakterien (AB5A, AB10), α -Proteobakterien (AB33), Firmicutes (AB4, AB 11A, AB15) und Actinobakterien (AB30) gehörten (Abb. 4.16, Tab. 4.1).

Die Sequenz des Bakterienisolates AB4 besaß eine 100%ige Übereinstimmung mit der von *Bacillus cereus* und *B. mycooides*. Die Länge der erhaltenen Sequenz reichte nicht aus, um das Bakterium einer der beiden Vergleichsarten direkt zuzuordnen zu können. Mit einer Sequenzübereinstimmung von 99,88% ließ sich das Isolat AB11A als *Bacillus subtilis* bestimmen. Das dem Isolat AB15 nächst verwandte Bakterium war *Bacillus megaterium* (96,12%, Abb. 19 a). Isolat AB10 konnte mit einer Sequenzübereinstimmung von 99,66% als *Pseudomonas stutzeri* bestimmt werden. Als weiteres Gammaproteobakterium besaß das Isolat AB5A eine hohe Ähnlichkeit zum Bakterium *Halomonas marina* (99,64%). Das isolierte Actinobakterium (AB30) besaß im Sequenzvergleich die größte Ähnlichkeit mit *Micrococcus luteus* (98,95%, Abb. 19 b). Das isolierte α -Proteobakterium (Isolat AB33) entsprach einem nichtkultivierten Schwammbakterium in *Aplysina aerophoba* (99,29%, Hentschel et al. 2001).

Tab. 4.1: Nächstverwandte Bakterien der Isolate aus *Axinella verrucosai*

Name	Länge (Basen)	Nächster Verwandter	Prozent Übereinstimmung	GenBank Accession-Nr.
AB4	898	<i>Bacillus cereus</i>	100%	AF290554
		<i>Bacillus mycooides</i>	100%	Z84582
AB 5A	862	<i>Halomonas marina</i>	99,64%	M93354
AB 10	596	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99,66%	AF054933
AB 11A	884	<i>Bacillus subtilis</i>	99,88%	X60646
AB 15	830	<i>Bacillus megaterium</i>	96,12%	D16273
AB 30	889	<i>Micrococcus luteus</i>	98,95%	AF057290
AB 33	904	Alphaproteobakterium aus <i>Aplysina aerophoba</i>	99,29%	AF218241
		<i>Roseibium hameliense</i>	95,93%	D85836

4.4 Genetische Diversität der Bakterien in *Axinella verrucosa*

Da sich nicht alle mit Schwämmen vergesellschafteten Bakterien isolieren lassen, wurde die Diversität der Bakterien mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden erfasst. Zur möglichst optimalen DNA-Isolation aus den Schwammproben wurden verschiedene DNA-Extraktionsmethoden getestet. Die Extraktion mit dem Fast DNA Kit für Bodenproben hat sich für die Schwammproben als die günstigste Methode herausgestellt, da sie eine gute DNA Ausbeute bei einer hohen Reinheit der DNA erbrachte. Mit der CTAB-Methode wurde zwar deutlich mehr DNA isoliert, trotz der teils mehrfachen Reinigung mit Phenol-Chloroform war die DNA aber anschließend immer noch mit Proteinen und Polysacchariden verunreinigt. Bei den anderen getesteten DNA-Extraktionskits (vgl. 3.3.1.1) war die DNA-Ausbeute geringer. Da die untersuchte bakterielle DNA nur einen Bruchteil der Gesamt-Proben-DNA ausmachte, war eine gute Ausbeute und eine saubere DNA für die weiteren Schritte entscheidend. Die in den Schwämmen oft in großen Mengen vorkommenden Sekundärmetabolite und das Kollagen des Mesohyls sowie des Spongins können stark hemmend auf die DNA-Amplifikation während der PCR einwirken (Newton und Graham 1994, Kim et al. 2000).

4.4.1 Klonierte bakterielle Diversität in *Axinella verrucosa*

Bei den Klonierungsexperimenten der 16S rRNA wurden 134 der gewonnenen Bakterienklone durch einen Restriktionsverdau (Abb. 4. 17) charakterisiert und jeweils Parallelproben der Bakterien mit unterschiedlichen Verdauemustern sequenziert. Der Großteil der untersuchten Klone gehörte zu den drei γ -Proteobakterien Clustern, deren Vertreter sowohl aus den *Axinella verrucosa* Schwammproben E01-9, E01-16 des Mittelmeeres und aus der Atlantikprobe R01-2 gewonnen wurden. Die Sequenzen unterschieden sich deutlich von bisher beschriebenen Sequenzen, so dass sie keiner bisher bekannten Bakterienart zugeordnet werden konnten. Die Bakterien aus Cluster Gamma-I hatten die größte Übereinstimmung mit einem unkultivierten planktischen Klon aus dem Atlantik (92,94%) und das nächstverwandte Bakterium war *Pseudomonas jessenii* mit einer Übereinstimmung von 87,72% (Tab. 4.2, Abb. 4.18).

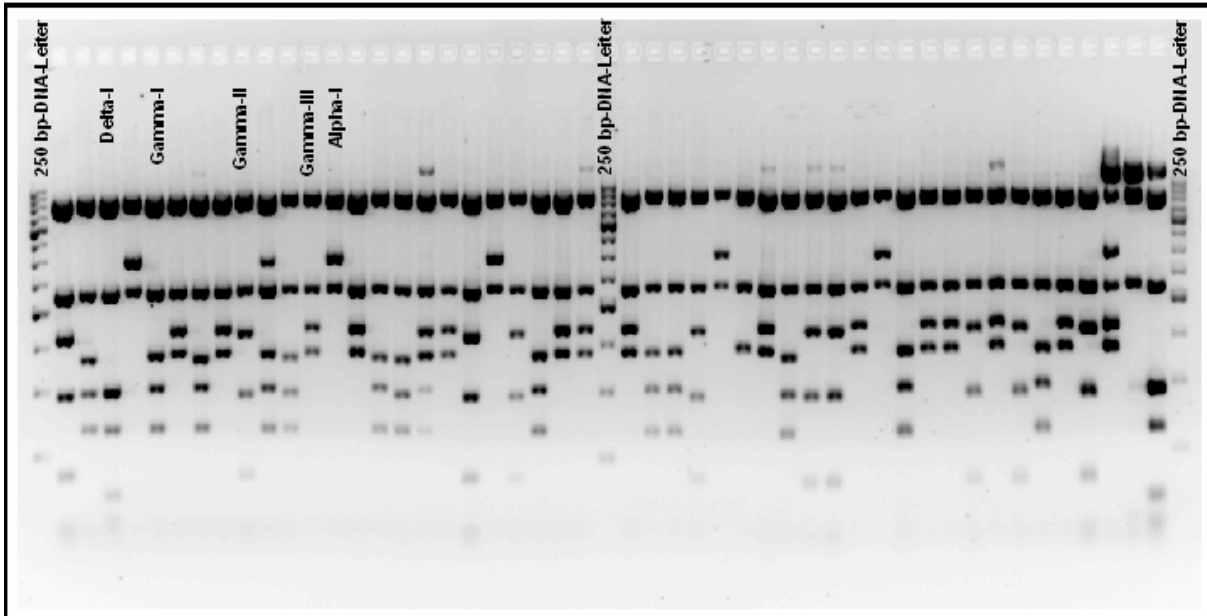


Abb. 4.17: Agarosegel des Klonierungsansatzes der amplifizierten Bakteriensequenzen aus *Axinella verrucosa* nach dem 7-fachen enzymatischen Verdau. Es lassen sich fünf verschiedene Bandenmuster unterscheiden, die den Sequenzen Alpha-I, Gamma-I bis -III und Delta-I entsprechen.

Cluster Gamma-II besaß als nächst ähnliche Sequenz die eines nicht kultivierten Bakteriums aus antarktischem Sediment (91,3%) und zu dem Bakterium *Marichromatium purpuratum* (87,75%). Auffällig war eine deutliche taxonomische Nähe zu einer Reihe von symbiontischen Bakterien in den Kiemen verschiedener Muschelarten.

Die Bakterien des Clusters Gamma-III hatten als ähnliche Verwandte verschiedene unkultivierte Bakterien aus den Schwämmen *Theonella swinhoei* und *Rhopaloeides odorabile* (Webster et al. 2001b, Hentschel et al 2002). Das nächste bekannte Bakterium war *Pseudomonas iners*, mit einer Übereinstimmung der 16S rRNA von 88,61%. Aus der Schwammprobe E01-16 wurde eine Sequenz (E01-16-3) mit größter Ähnlichkeit zu einem unkultivierten Bakterium aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* isoliert (93,05%). Das ähnlichste bekannte Bakterium war *Nitrospira marina* (88,61%, Abb. 4.20 a).

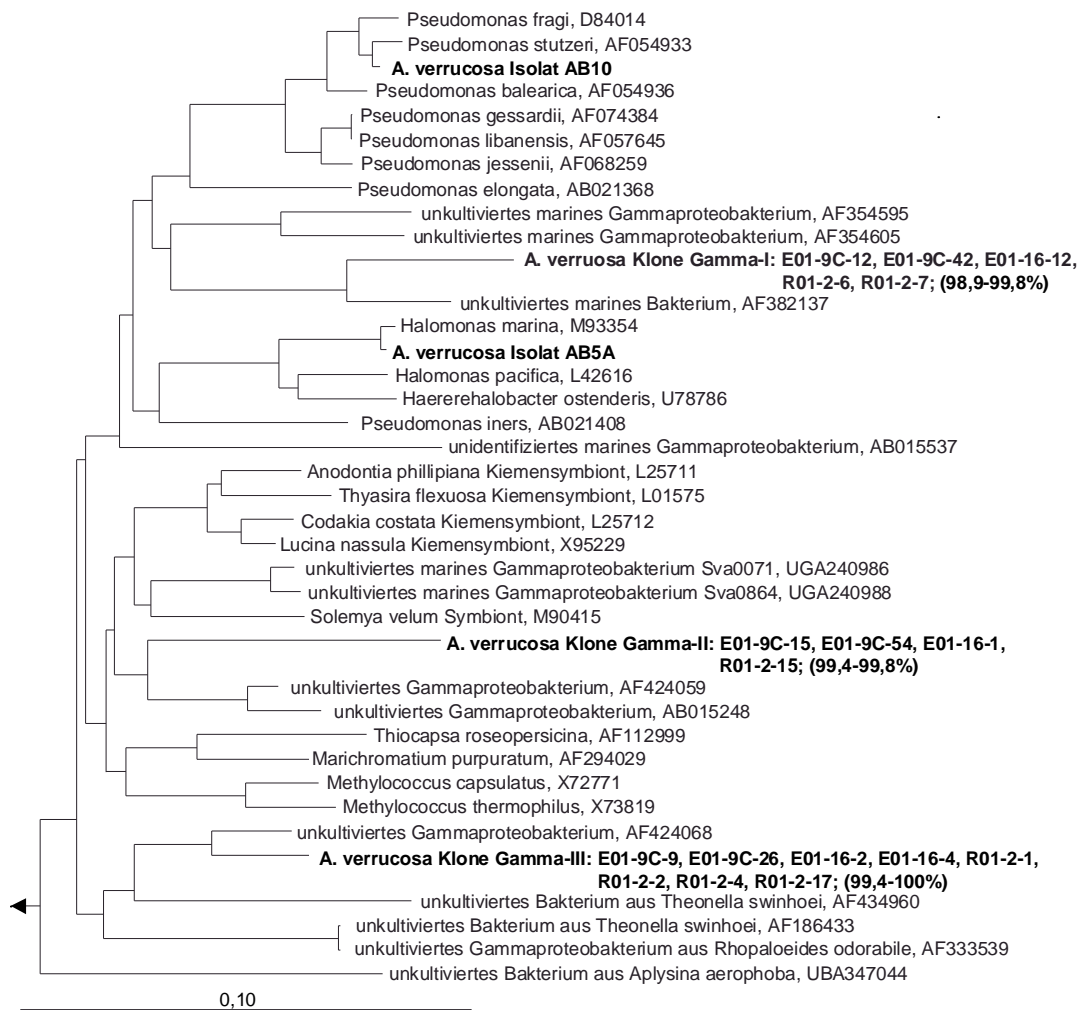


Abb. 4.18: Phylogenetischer Stammbaum der Klonsequenzen und Sequenzen der isolierten γ -Proteobakterien aus *Axinella verrucosa*. Die Berechnung erfolgte aufgrund der 16S rRNA Sequenzen mit „neighbor-joining“ und „parsimony“. Der Maßstrich gibt eine 10%ige Sequenz-Differenz an. Der Pfeil führt zur „outgroup“.

In der Klondatenbank von E01-9C traten Sequenzen auf, die den α -Proteobakterien (E01-9/C4, E01-9C/5, E01-9C/33) und δ -Proteobakterien (E01-9C23) zugeordnet werden konnten. Die 16S rRNA des Alphaproteobakteriums besaß nur eine geringe Ähnlichkeit zu bisher beschriebenen Bakterien. Die größte Übereinstimmung mit 87,72% war mit einem unkuivierten planktischen Bakterium aus dem Mittelmeer. Das genetisch nächstverwandte bestimmte Bakterium war *Aminobacter amnivorans* (86,71%). Unter den ähnlichsten Bakterien waren α -Proteobakterien, die aus den Schwämmen *Aplysina aerophoba* oder *Halichondria panicea* isoliert wurden (Althoff et al. 1998, Hentschel et al. 2002, Abb. 20 b).

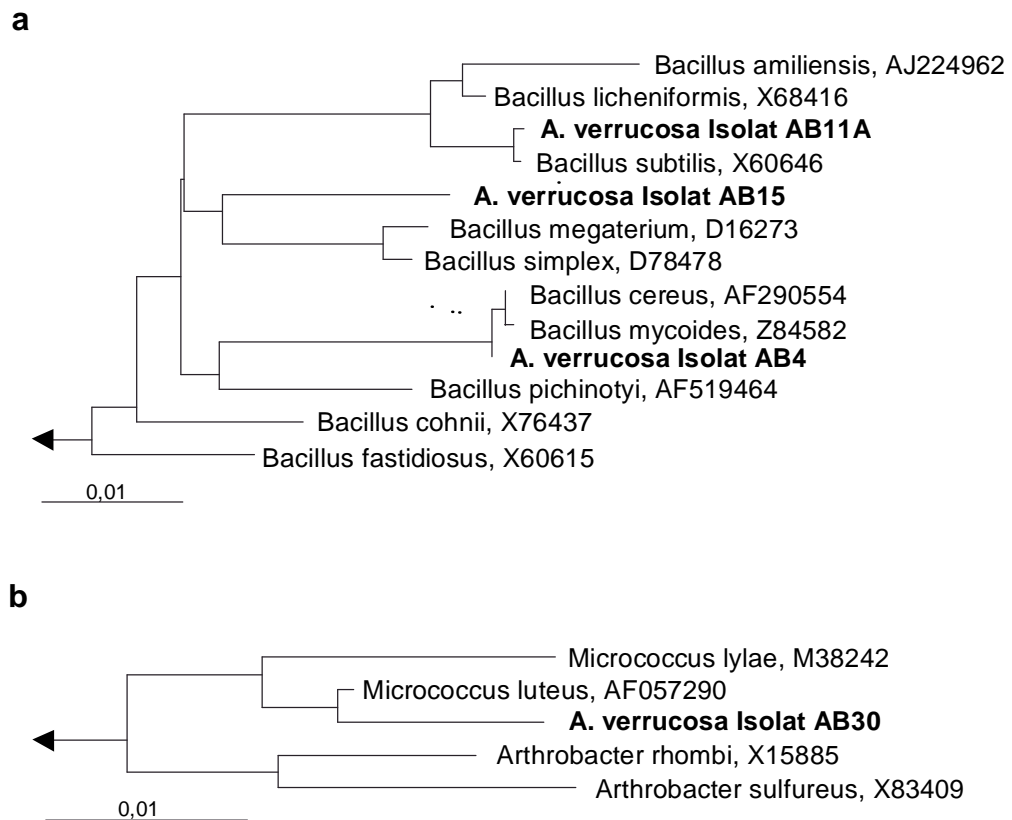


Abb. 4.19: Phylogenetischer Stammbaum der Sequenzen der isolierten Firmicutes (a) und Actinobakterien (b) aus *Axinella verrucosa*. Die Berechnung erfolgte aufgrund der 16S rRNA Sequenzen mit „neighbor-joining“ und „parsimony“. Der Maßstrich gibt eine 1%ige Sequenz-Differenz an. Der Pfeil führt zur „outgroup“.

Das identifizierte δ -Proteobakterium aus einer *A. verrucosa* Probe des Mittelmeeres besaß ebenfalls nur eine geringe Übereinstimmung der ribosomalen RNA mit bereits beschriebenen Bakterien. Die ähnlichste Sequenz (90,64%) besaß ein nicht kultiviertes aquatisches Bakterium aus mikrobiellen Matten (Holmes et al. 2001) und das nächstverwandte Bakterium war *Anaeromyxobacter dehalogenans* mit einer Übereinstimmung von 84,05% (Abb. 20 c).

Ein weiterer Mikroorganismus, der nicht bei den Klonierungsansätzen, sondern erst nach der Reamplifikationen der DNA aus den SSCP-Gel-Banden nachgewiesen wurde, ist ein Vertreter der Crenarchaeota. Diese besaß eine hohe Übereinstimmung der 16S rRNA mit zuvor aus *Axinella damicornis* (99,37%) und *A. verrucosa* (97,81%) beschriebenen Crenarchaeoten aus dem westlichen Mittelmeer (Margot et al. 2002). *Cenarchaeum symbiosum* war das nächst verwandte Archaeobakterium

(93,46%), das aus einem Schwamm der Gattung *Axinella* aus dem Pazifik isoliert wurde (Preston et al. 1996, Abb. 21).

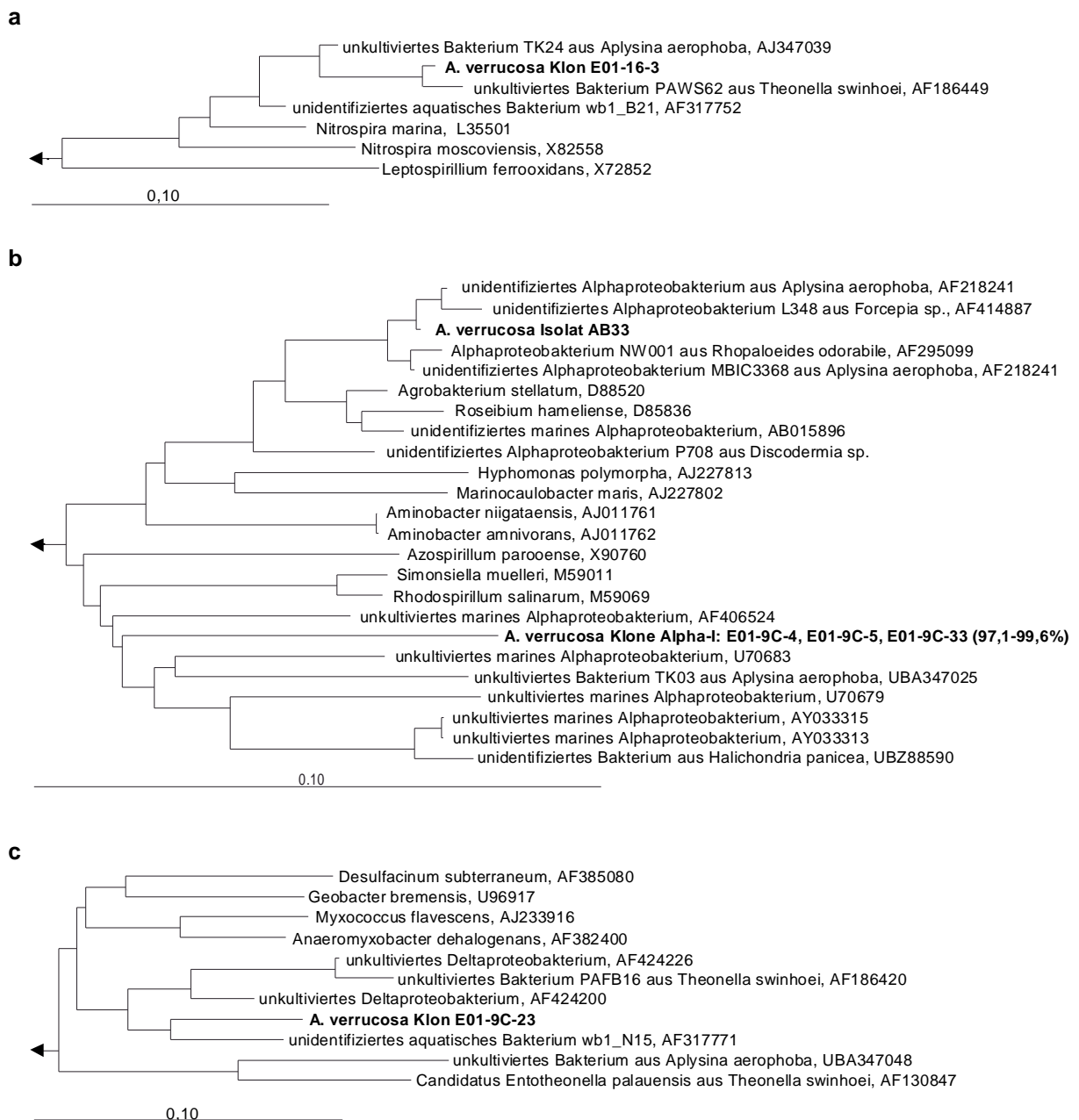


Abb. 4.20: Phylogenetischer Stammbaum der Klonsequenzen und Sequenzen der isolierten Bakterien der Gruppen *Nitrospira* (a), α -Proteobakterien (b) und δ -Proteobakterien (c) aus *Axinella verrucosa*. Die Berechnung erfolgte aufgrund der 16S rRNA Sequenzen mit „neighbor-joining“ und „parsimony“. Der Maßstrich gibt eine 10%ige Sequenz-Differenz an. Der Pfeil führt zur „outgroup“.

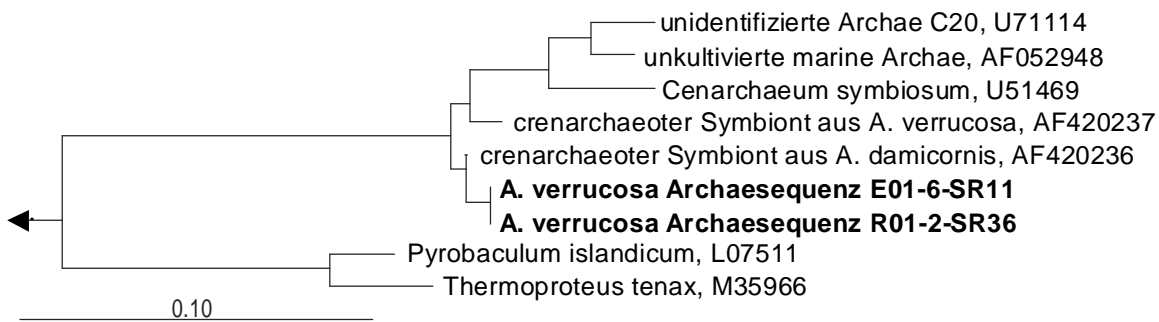


Abb. 4.21: Phylogenetischer Stammbaum der Sequenzen der Archäebakterien aus *Axinella verrucosa*. Die Berechnung erfolgte aufgrund der 16S rRNA Sequenzen mit „neighbor-joining“ und „parsimony“. Der Maßstrich gibt eine 10%ige Sequenz-Differenz an. Der Pfeil führt zur „outgroup“.

Tab. 4.2: Taxonomische Einordnung der aus *Axinella verrucosa* klonierten Bakterien- und Archae-Sequenzen

Name	Länge (Basen)	Nächster Verwandter	Prozent Übereinstimmung	GenBank Accession-Nr.
E01-9C-5 Alpha-I	1472	unkultiviertes marines α -Proteobakterium	87,72%	AF406524
		<i>Aminobacter amnivorans</i>	86,71%	AJ011762
E01-9C-12 Gamma-I	1511	unkultiviertes marines Bakterium	92,94%	AF382137
		<i>Pseudomonas jessenii</i>	87,72%	AF068259
E01-9C-15 Gamma-II	1521	unkultiviertes γ -Proteobakterium	91,30%	AF424059
		<i>Marichromatium purpuratum</i>	87,75%	AF294029
E01-9C-26 Gamma-III	1518	unkultiviertes γ -Proteobakterium	95,76%	AF424068
		<i>Pseudomonas iners</i>	88,61%	AB021408
E01-9C-23 Delta-I	1520	unidentifiziertes aquatisches Bakterium	90,64%	AF317771
		<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	84,05%	AF382400
E01-16-3 Nitrospira-I	411	unkultiviertes Bakterium aus <i>Aplysina aerophoba</i>	93,05%	UBA347039
		<i>Nitrospira marina</i>	88,61%	L35501
E01-6-SR11 Crenarch-I	321	crenarchaeoter Symbiont aus <i>Axinella damicornis</i>	99,37%	AF420236
		<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	93,46%	U51469

4.4.2 Vergleich der Bakterienpopulationen von *Axinella verrucosa* und Vergleichsschwämmen mit SSCP und DGGE

Mit Hilfe der Denaturierenden Gelelektrophorese (DGGE) und der Einzelstrang Konformationspolymorphismus Methode (single strand conformation polymorphism, SSCP) kann die Diversität der Schwambakterien von verschiedenen Proben untersucht werden, ohne dass man für jede der Schwammproben einen aufwendigen Klonierungsansatz durchführen muss. Neben dem Vergleich der verschiedenen Schwammproben untereinander, kann man hierdurch auch die aus den Klonierungsansätzen erhaltene bakterielle DNA mit der in den Schwammproben nachweisbaren vergleichen.

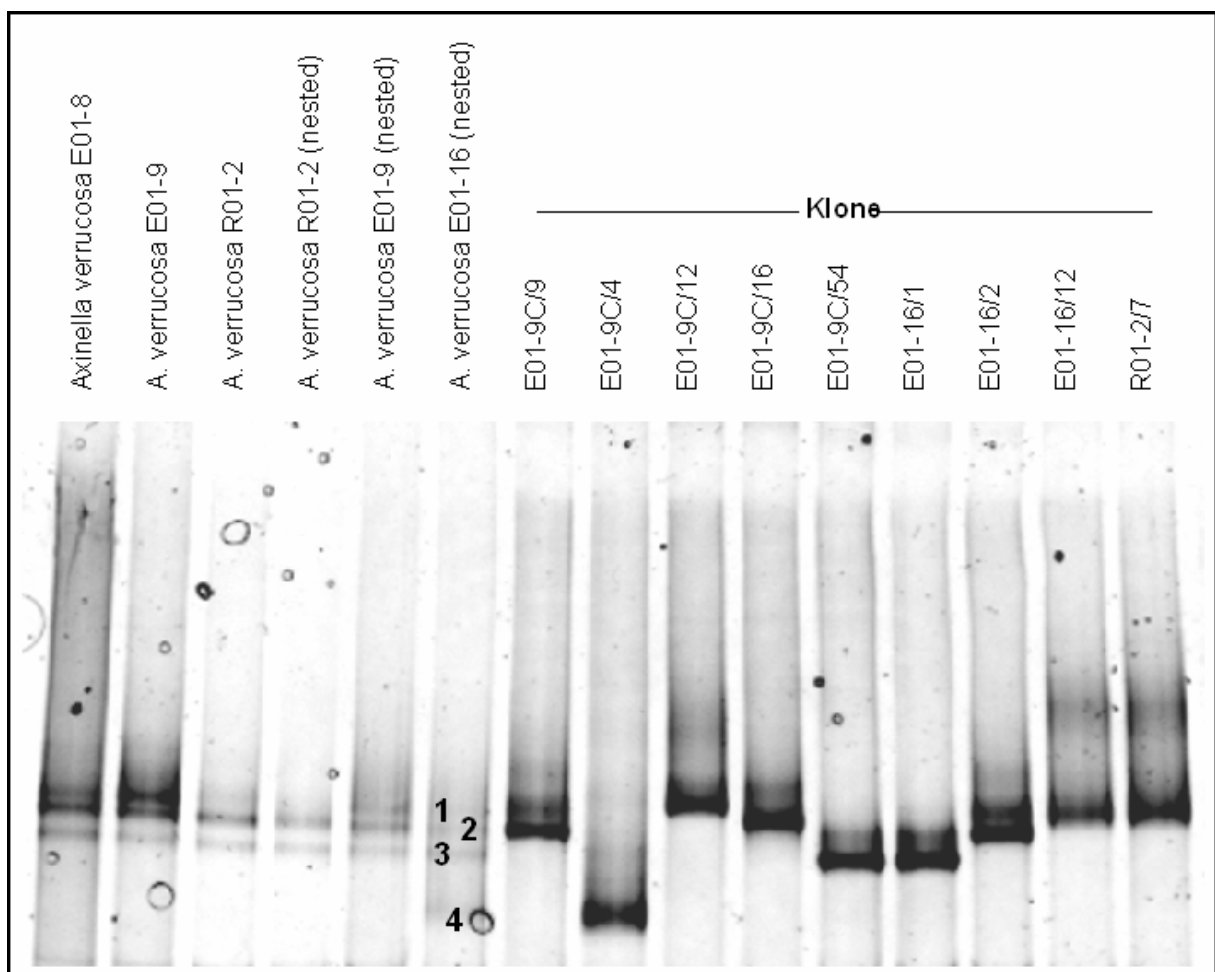


Abb. 4.22: DGGE-Gel mit *Axinella verrucosa*-Schwammproben und Klon-DNA als Vergleich. Parallel sind Schwammproben aufgetragen, die direkt mit den DGGE-Primern amplifiziert wurden und solche die zuvor mit generellen bakteriellen Primern vervielfältigt wurden (nested).

Die DGGE-Analyse (Abb. 4.22) zeigte den Vergleich von vier verschiedenen *Axinella verrucosa*-Proben aus dem Mittelmeer und dem Atlantik. Dabei wurde die DNA der Proben der ersten drei Spuren direkt mit den DGGE-Primern vervielfältigt und die DNA der Proben der Bahnen vier bis sechs zuerst mit generellen Bakterienprimern amplifiziert und die daraus erhaltene DNA anschließend mit den DGGE-Primern vervielfältigt. Neben den Schwammproben wurden die Amplifikate der aus *A. verrucosa* klonierten Bakterien-DNA aufgetragen.

Alle sechs Schwammproben zeigten konstant drei dicht beieinander liegende Banden (Abb. 22, 1-3). Sie besaßen teils unterschiedliche Intensitäten, waren aber sowohl bei den direkt für die DGGE amplifizierten Proben, als auch bei den zuerst mit den generellen bakteriellen Primern vervielfältigten Ansätzen vorhanden. Die generellen Bakterienprimer waren die gleichen, die auch für die Klonierungsansätze benutzt wurden. Der Ansatz war somit eine Kontrolle, ob bei den Klonierungsansätzen und der DGGE potentiell die gleichen Bakterien erfasst werden konnten. Dass dies der Fall war, zeigen die gleichen Ergebnisse der Proben E01-9 und R01-1, die mit beiden Ansätzen untersucht wurden (die Bezeichnungen E01-9, E01-16 und R01-2 entsprechen den Schwammprobennummerierungen, Tab. 2.1, die folgenden Zahlen den DNA-Klonen der Proben). Die Probe E01-16 zeigte neben den drei Banden der anderen Proben eine weitere Bande (4), die nur hier auftrat.

Ein Vergleich mit den DNA-Klonen zeigte, dass jeder Bande der Schwammproben, die Bande eines DNA-Klons zugeordnet werden konnte. So entsprachen die Banden 1-3 den drei γ -Proteobakteriensequenzen aus der Klondatenbank: Bande 1 der Sequenz Gamma-I, Bande 2 der Sequenz Gamma-III und die dritte Bande Gamma-II (Abb. 4.18, Abb. 4.22). Bande 4 der Schwammprobe E01-16 entsprach der DNA-Klon-Bande E01-9C/4 und ließ sich anhand der Sequenz als α -Proteobakterium (Klon Alpha-I) bestimmen. Bei den DGGE-Untersuchungen war das α -Proteobakterium nur in der *A. verrucosa* Schwammprobe E01-16 nachweisbar, über den Klonierungsansatz aber auch in der Probe E01-9 (Abb. 4.20 b).

Bei den SSCP-Untersuchungen zur bakteriellen Diversität wurden sechs *A. verrucosa* Proben aus dem Mittelmeer und dem Atlantik miteinander verglichen und drei Vergleichsschwämmen und Bakterienklonen gegenübergestellt (Abb. 4.23 a). Die Banden der *A. verrucosa* Proben stimmten miteinander überein, nur die Intensitäten der Banden variierten. Sie ließen sich auch wieder den Banden der Klonsequenzen

zuordnen. Im Vergleich zu den DGGE-Untersuchungen traten nun zwei zusätzliche Banden auf. Die oberste Bande entsprach der Sequenz des Bakterienklons Delta-I. In ähnlicher Höhe traten auch Banden bei den Schwämmen *Acanthella acuta* und *Spirastrella cunctatrix* auf (Abb. 23 a, 1). Die zweite Bande konnte keinem der Bakterienklone zugeordnet werden (Abb. 23 a, 2).

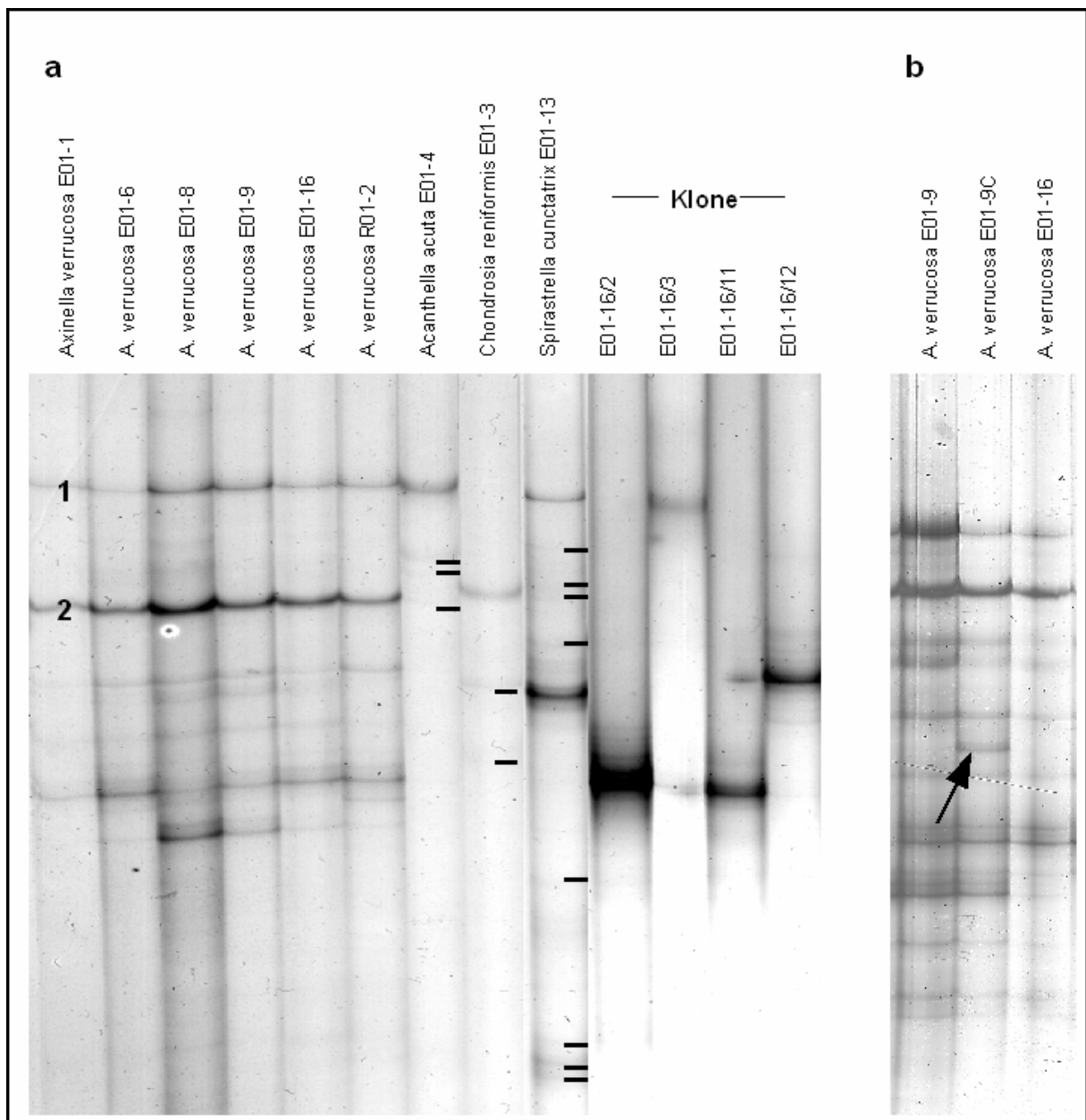


Abb. 4.23: SSCP-Gel mit verschiedenen *Axinella verrucosa*-Schwammproben und drei weiteren Schwammarten sowie Klon-DNA zum Vergleich (a). Schwache Banden sind mit Balken markiert. b: Vergleich verschiedener DNA-Isolationsmethoden durch SSCP.

Der Vergleich von verschiedenen Aufarbeitungen einer Schwammprobe zeigte Unterschiede im Bandenmuster bei der SSCP (Abb. 23 b). Bei den Proben E01-9 und E01-16 wurde das gesamte Schwammgewebe bei der DNA-Extraktion eingesetzt, bei Probe E01-9C erfolgte zuvor eine mechanische Isolation des Spongins. Als Ergebnis zeigte die Probe mit dem isolierten Spongin eine zusätzliche Bande (Abb. 23 b, Pfeil). Diese Bande lag auf der Höhe des α -Proteobakterien-Klons. Dass auch alle anderen Banden der Vergleichsproben ausgeprägt waren, zeigt dass immer noch genug Gewebereste an dem isolierten Spongin vorhanden waren, so dass das gesamte mikrobielle Spektrum dargestellt werden konnte. Die Kontrolle der DNA-Extraktion nach den Lysierungsschritten an den abgetrennten Zellbestandteilen zeigte, dass sich mit dem DNA-Farbstoff DAPI immer noch intakte Bakterienzellen im Spongin nachweisen ließen, wohingegen alle Bakterien des Gewebes aufgelöst waren. Das Spongin stellt somit eine starke Barriere bei der DNA-Extraktion dar. Nur durch die deutliche Reduzierung der Zahl an Mesohylbakterien durch die Sponginisolation war die DNA-Konzentration der Bakterien im Spongin ausreichend, um nachweisbar in der PCR amplifiziert zu werden.

Zur Darstellung von Mikroorganismen aus verschiedenen Domänen wurde ein SSCP-Ansatz direkt mit den SSCP-Primern Com1 und Com2 angesetzt und parallel dazu die Schwammproben-DNA zuerst mit dem archaebakterienspezifischen Primer ARCH20 und mit Com2 vervielfältigt. Das Produkt daraus wurde mit den SSCP-Primern amplifiziert (Abb. 4.24, nested). Dabei zeigt sich, dass die *A. verrucosa*-Banden die keiner Klonbande zugeordnet werden konnte, einem Archaeobakterium entspricht. Nach der Sequenzierung der reamplifizierten DNA aus dem Polyacrylamidgel zeigte sich (Abb. 4.24, Bande B), dass die Sequenz mit der eines Crenarchaebakterium aus *Axinella damicornis* übereinstimmte (Margot et al. 2002). Die Reamplifikation der DNA der Banden E und F ergab eine Übereinstimmung mit der Sequenz Gamma-III und Bande D mit Gamma-I. Die Sequenz der Bande C hatte als nächsten realen Verwandten *Oceanospirillum linum* mit einer Sequenzübereinstimmung von 87,7%. Die Sequenz der Bande A von *Acanthella acuta* besaß die größte Ähnlichkeit mit dem γ -Proteobakterium *Halothiobacillus kellyi* (89,0% Übereinstimmung).

Eine DNA-Sequenz erzeugte nicht immer nur eine Bande im Gel. Die Sequenz Gamma-III ergab sowohl in der Schwammprobe, als auch bei den Klonproben meh-

rere dicht beieinander liegende Banden (Abb. 4.24: E, F, E01-16/2, E01-16/11, R01-2/1, E01-9C/9), dagegen besaß Klon E01-9C/23 nur eine einzige Bande.

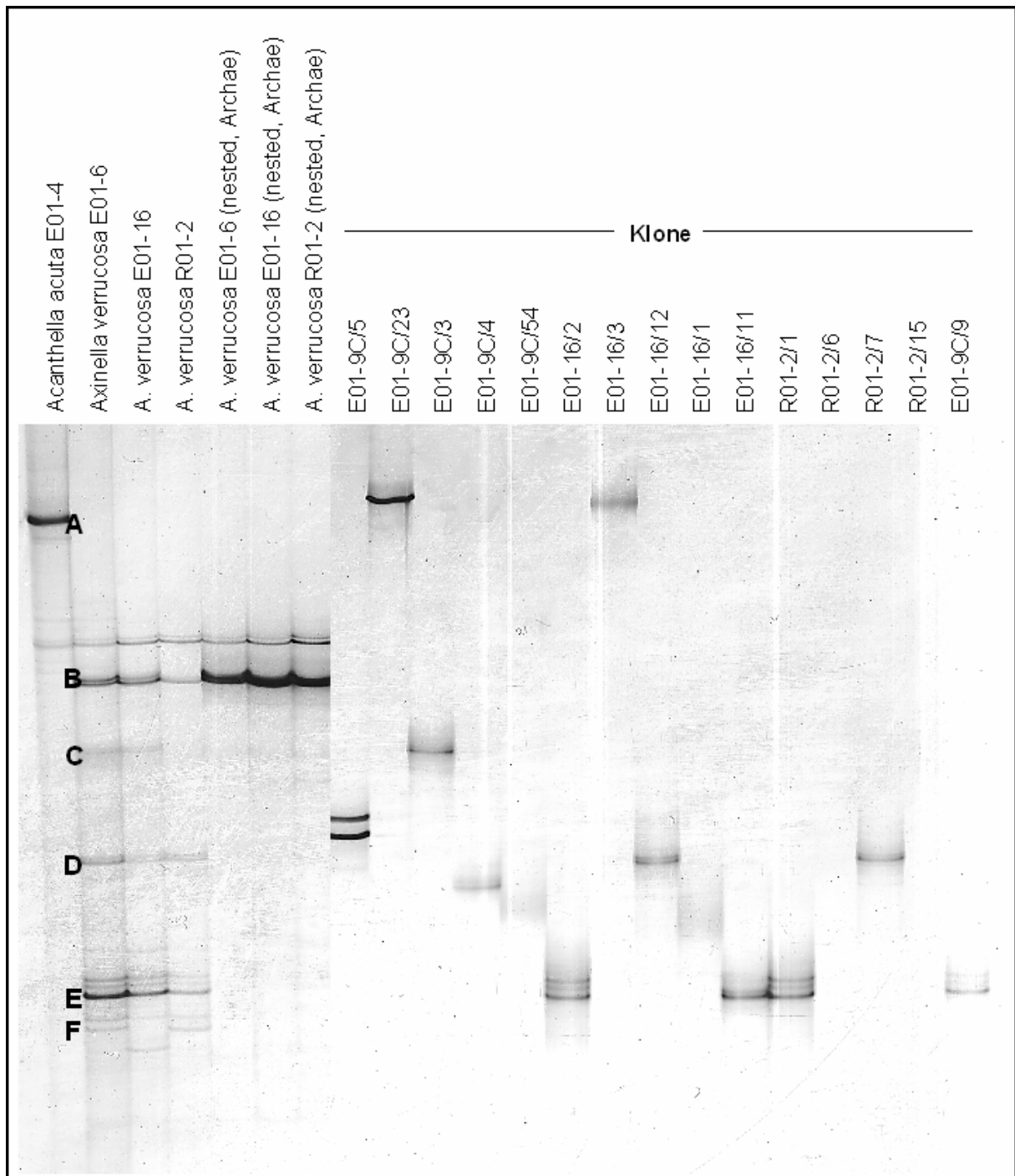


Abb. 4.24: SSCP-Gel mit verschiedenen *Axinella verrucosa* und einer *Acanthella acuta* Schwammproben sowie mit bakterieller Klon-DNA aus *A. verrucosa*. Die *A. verrucosa* Schwammproben wurden parallel erst mit archaebakterienspezifischen Primern amplifiziert (nested).

Die 16S rRNA Gen-Sequenzen der *Axinella verrucosa* Endobionten sind in der „EMBL“-Datenbank unter folgenden Nummern hinterlegt:

Klon	Accession-Nummer
Alpha-I (E01-9C-5)	AJ581348
Gamma-I (E01-9C-12)	AJ581349
Gamma-II (E01-9C-15)	AJ581350
Gamma-II (E01-9C-26)	AJ581351
Delta-I (E01-9C-23)	AJ581352
Nitrospira-I (E01-16-3)	AJ581353

4.5 Bestimmung der Bakterien in *Axinella verrucosa* durch Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

4.5.1 Untersuchung mit domäne- und gruppenspezifischen Gensonden

Mit verschiedenen spezifischen Gensonden konnten mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung Bakterien direkt im Schwammgewebe von *A. verrucosa* nachgewiesen werden. Da die Schwämme und besonders deren Spongin häufig eine deutliche Eigenfluoreszenz besitzen, waren die benutzten Sonden alle mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppelt. Die Eigenfluoreszenz des Schwammgewebes war bei der Anregung mit für Cy3 spezifischem Licht der Wellenlänge von 550nm deutlich geringer als bei jener für Fluorescein.

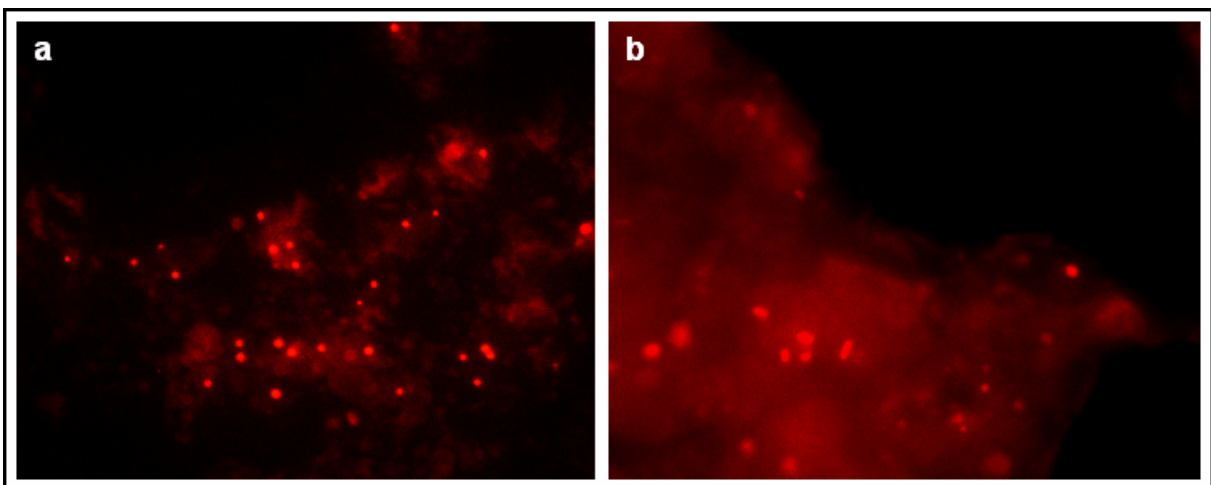


Abb. 4.25: *Axinella verrucosa*: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung von Gefrierschnitten mit der Bakterien-Sonde EUB338 (a) und mit der γ -Proteobakterien-Sonde Gam42a (b).

Die Hybridisierung mit der bakterienspezifischen Sonde EUB338 zeigte eine Markierung von ziemlich gleichmäßig im gesamten Gewebe verteilten Bakterien (Abb. 4.25 a). Deren Anzahl war im Vergleich zu anderen untersuchten Schwämmen (Friedrich et al. 1999) relativ gering, sowohl bei den Schwammproben des Mittelmeeres als auch des Atlantiks. Die γ -Proteobakterien spezifische Sonde Gam42a färbte Bakterien im Bereich des Mesohyls, mit teils rundem und teils stäbchenförmigem Umriss (Abb. 4.25 b). Die weiteren getesteten gruppenspezifischen Sonden Beta42a

(β -Proteobakterien), CF319a (Cytophaga), HGC69a (Actinomyceten), PLA46 (Planctomyceten) und LGC354a (Firmicutes) zeigten keine Markierungen in den Schwammproben. Die domänenspezifische Sonde für Archaeobakterien (ARCH915) zeigte nur vereinzelte Färbungen.

Mit der Sonde ALF968 (α -Proteobakterien) wurden vereinzelt unizelluläre Bakterien im Interzellularraum markiert (Abb. 4.25 c), allerdings in deutlich geringerer Dichte als mit der γ -Proteobakterien-Sonde. Zudem ließ sich mit der ALF968-Sonde die myzelartige Struktur im Spongin von *Axinella verrucosa* anfärben. Man erkannte dabei deutlich die einzelnen aneinander gereihten Zellen, die auch Verzweigungen bildeten (Abb. 4.26 c). Nicht alle Zellen des Geflechtes wurden gleich intensiv gefärbt, was einerseits auf unterschiedliche rRNA Gehalte zurückgeführt werden kann, andererseits durch eine blockierende Wirkung des Spongins kommen könnte. Die Sonde markierte die Sponginbakterien sowohl in den Mittelmeer- als auch den Atlantikproben.

Die δ -Proteobakterien-Sonde (SRB385) zeigte neben vereinzelt Markierungen im Mesohyl auch Färbungen, die auf bestimmte intrazelluläre Bereiche beschränkt waren. Sie ließen sich nicht in allen Zellen des Mesohyls nachweisen, sondern nur in meist vereinzelt vorkommenden Zellen, die teilweise aber auch räumlich eng beieinander lagen (Abb. 4.27). Teils waren dicht beieinander liegende Bakterien in den Schwammzellen markiert, in anderen Präparaten schienen vakuolenartige Strukturen als Ganzes gefärbt zu sein.

Die als Negativkontrolle benutzte Sonde NONEUB erbrachte keine Markierung im Schwammgewebe, wodurch sich unspezifische Markierungen der Sonden ausschließen ließen.

Zur Überprüfung des Hybridisierungserfolges, wurden die Präparate parallel mit einer DNA-Färbung (DAPI) markiert. Die DNA-Färbung bei den filamentbildenden α -Proteobakterien im Spongin, zeigte eine auf den zentralen Zellbereich der Bakterien beschränkte Markierung (Abb. 4.26 a), wohingegen die Gensonden den gesamten Zellbereich markierten (Abb. 4.26 d-e).

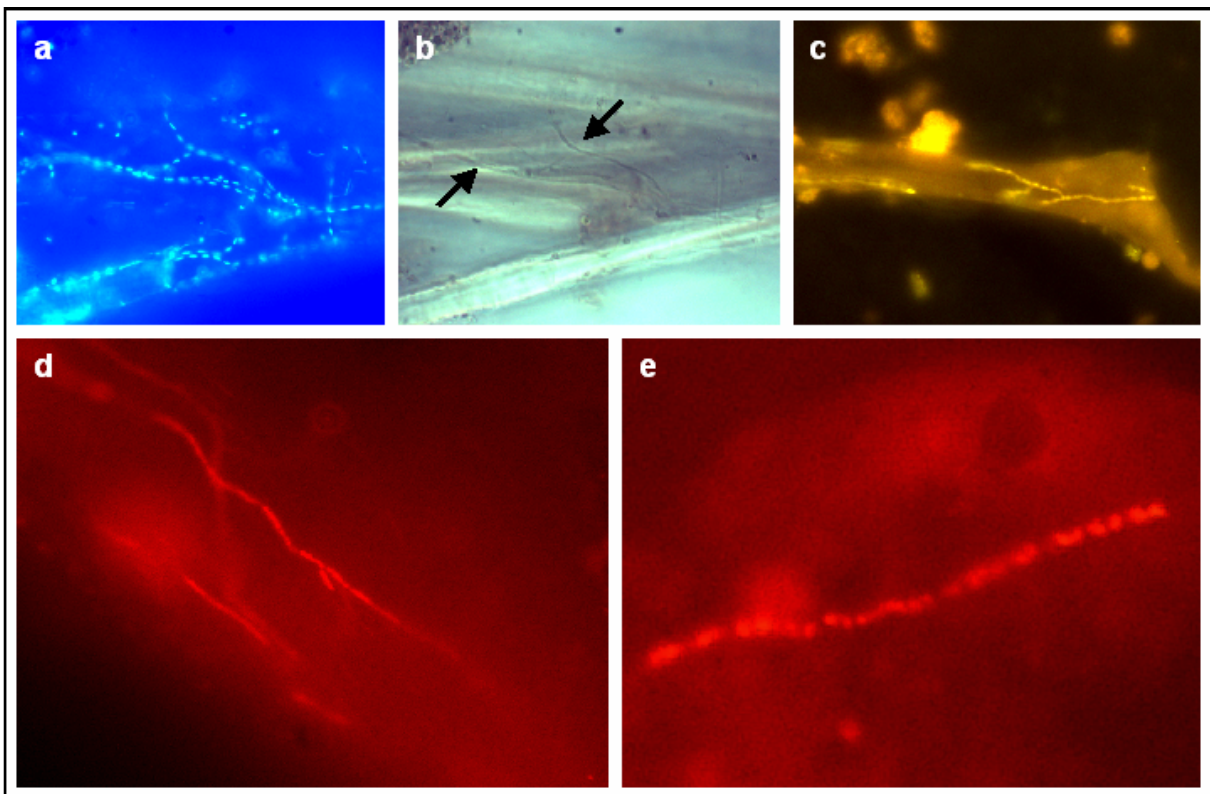


Abb. 4.26: *Axinella verrucosa*: a: DNA-Färbung der Bakterien im Spongium (DAPI) und vergleichende Hellfeldaufnahme (b). FISH-Markierung der Spongiumbakterien mit der Bakteriensonde EUB338 an isoliertem Spongium (c) und mit der generierten Sonde Ax5-439 für die α -Proteobakteriensequenz aus der Klondatenbank von *A. verrucosa* an Gefrierschnitten (d-e). Die Sonde markiert sowohl den schmalen (d), als auch den breiteren Bakterientyp (e) des mikrobiellen Geflechtes.

4.5.2 Generierung von spezifischen Gensonden für *Axinella verrucosa*-Bakterien

Da sich das Spongiumbakterium mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung mit der ALf968-Sonde als α -Proteobakterium bestimmen ließ, wurde eine Gensonde für die bei der Klonierung gewonnene 16S rRNA Sequenz der α -Proteobakterien Cluster Alpha-I entwickelt. Des Weiteren wurde eine Sonde für die Sequenz des δ -Proteobakteriums generiert, da die räumlich begrenzte Lokalisation der Bakterien auf eine potentielle Assoziation mit den Schwämmen hinwies.

Die Sondenberechnung mit dem ARB-Programm ergab für die Alpha-I Sequenzen ein 18 Basen langes Oligonucleotid an der *E. coli* Position 439. Die potentiellen Fluoreszenzeigenschaften der Sonde waren nach Fuchs et al. (1998) der Helligkeitsklasse III zuzuordnen, was der Intensität der Eubakteriensonde EUB388 entsprach.

Die entwickelte Sonde wird im Folgenden als Ax5-439 bezeichnet, ihre Sequenz ist 5'→3' CACCGGGGAGGATGATGA. Ax5-439 besaß mindestens zwei Basen-Fehlpaarungen zu allen verglichenen Sequenzen des Datenbankvergleichs (Tab. 4.3). Dabei handelte es sich bei dem Vergleich mit den determinierten Bakterien um starke Fehlpaarungen (Hugenholtz et al. 2002).

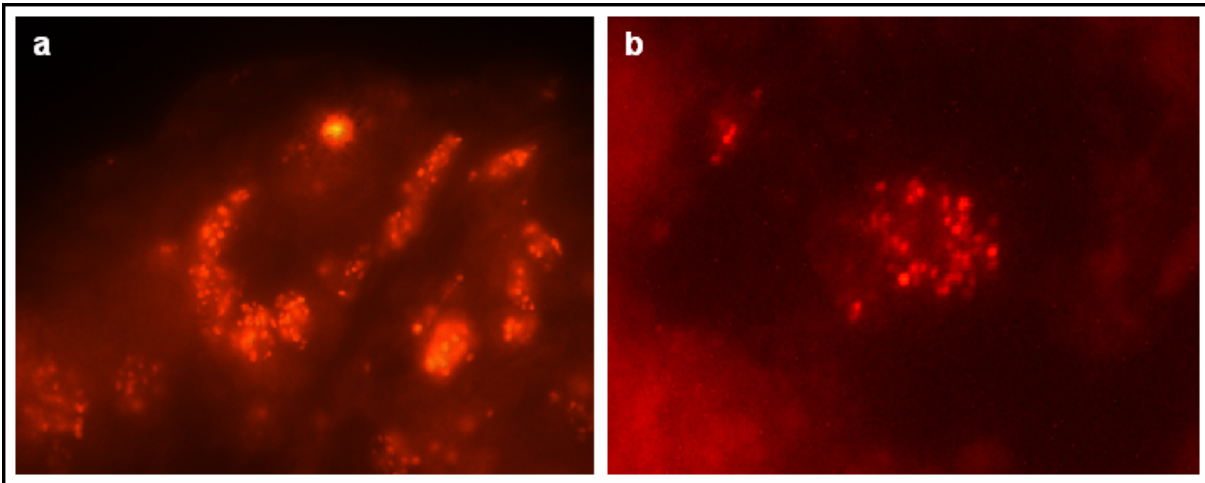


Abb. 4.27: *Axinella verrucosa*: FISH-Markierung der δ -Proteobakterien in den Schwammzellen mit der Sonde SRB385 (Sulfatreduzierende Bakterien, a) und der generierten Sonde für den *A. verrucosa* Klon Delta-I, Ax23-200 (b).

Für die Testung der Sondenspezifität wurden Reinkulturen von Bakterien mit der ähnlichsten Sequenzen im Sondenbereich hybridisiert. Die Kontrolle erfolgte mit *Acetobacter oboediens* (DSMZ 11826) und *Acetobacter xylinus* (DSMZ 2004). Beide Bakterienarten wurden mit einer Stringenz von 0-45% Formamid in 5% Schritten mit der Ax5-439 Sonde parallel zu *Axinella verrucosa* Gewebeschnitten hybridisiert. Bei den getesteten Bakterien konnten keine Zellen mit der Sonde markiert werden, auch nicht bei den unstringenten Bedingungen mit 0% Formamid. Sie ließen sich aber in Kontrollansätzen mit den Sonden EUB338 und Alf968 markieren (Abb. 4.28). Diese Ergebnisse zeigten die hohe Spezifität der entwickelten Sonde für das nicht kultivierte α -Proteobakterium in *A. verrucosa*.

Bei der Hybridisierung der *A. verrucosa* Schnitte mit der entwickelten Sonde Ax5-439 wurden nur die filamentbildenden Bakterien im Spongin markiert. Bis zu einer Stringenz von 35% Formamid (FA) war die Markierung deutlich, bei 40% FA waren nur noch vereinzelt Bakterien markiert und ab 45% FA konnte keine Färbungen mehr

nachgewiesen werden. Auch bei den Markierungen mit niedrigerer Stringenz kam es zu keiner unspezifischen Markierung der anderen Schwambakterien. Die Sonde färbte sowohl die fädigen Bakterien im Skelett der mediterranen, als auch der atlantischen Schwammproben von *A. verrucosa*.

Aus den berechneten Sonden für die Delta-I Sequenz, wurde ein 19 Basen langes Oligonucleotid an der *E. coli* Position 200 ausgewählt. Der Datenbankvergleich ergab für die Sonde in einem Fall eine starke Fehlpaarung von drei Basen, ansonsten besaßen die Vergleichssequenzen mindestens fünf Basenfehlpaarungen (Tab. 4.4). Die Sequenz der Sonde Ax23-200 ist 5'→3' GGCCTCTCGTAGAAGCTAC. Die potentiellen Fluoreszenzeigenschaften der Sonden lagen in der Helligkeitsklasse II (Fuchs et al. 1998) und waren somit noch besser als bei der generierten α -Proteobakterien-sonde. Aufgrund der hohen Basen-Fehlpaarungen zu den nächsten Vergleichsarten konnte auf die Testung der Sonde mit Vergleichsbakterien verzichtet werden.

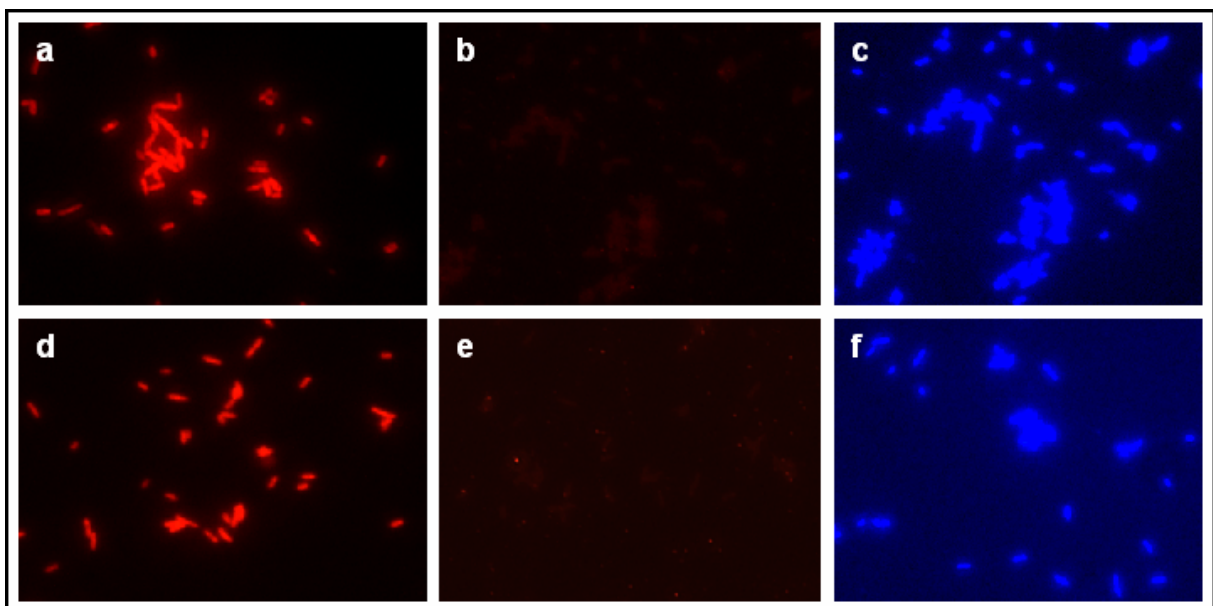


Abb. 4.28: Testung der entwickelten Gen-Sonde Ax5-439: Markierungsansätze der Vergleichsbakterien *Acetobacter oboediens* (a-c) und *Acetobacter xylinus* (d-f) mit der α -Proteobakterien-sonde ALF968 (a, d) und der neu entwickelten Sonde Ax5-439 (b, e). Die Abbildungen c und f sind die parallelen DNA-Färbungen (DAPI) der Proben in Abbildung b und e.

Mit der Ax23-200 Sonde wurden im Schwammschnitt die gleichen Strukturen, wie mit der SRB385 Sonde markiert (Abb. 4.27). Eine deutliche Markierung war bis zu einer Formamid-Konzentration von 35% detektierbar. Bei geringerer Stringenz kam es zu

keiner unspezifischen Markierung im Schwammgewebe. Wieder wurden die gleichen Strukturen sowohl in den Mittelmeerschwämmen, als auch den atlantischen Schwammproben markiert.

Tab. 4.3: Liste der ähnlichsten Bakteriensequenzen der Sonde Ax5-439 (mis: Basenunpaarungen, wmis: Gewichtung der Basenunpaarungen, pos. ecoli: Position der Sonde auf der rRNA nach *E. coli* Nummerierung).

Name	mis	wmis	pos. ecoli	'CACCGGGGAGGATGATGA'
<i>Paenibacillus sp.</i>	2	2,1	185	UCCUUUCC-====U=====g=====AAGGCGGAG
<i>Acetobacter oboediens</i>	2	2,6	439	AAGCACUUU-==G=====U=====CGGUACCCG
<i>Acetobacter intermedius</i>	2	2,6	439	AAGCACUUU-==G=====C=====CGGUACCCG
<i>Acetobacter xylinus</i>	2	2,6	439	AAGCACUUU-==G=====C=====CGGUACCCG
<i>Acetobacter europaeus</i>	2	2,6	439	AAGCACUUU-==G=====C=====CGGUACCCG
<i>Acetobacter entanii</i>	2	2,6	439	AAGCACUUU-==G=====C=====CGGUACCCG
<i>Acetobacter hansenii</i>	2	2,6	439	AAGCACUUU-==G=====C=====CGGUACCCG
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2	3	439	AAAUUCUUU-====C===A====CGUUACCCG
<i>Brevundimonas intermedia</i>	2	3	439	AAAUUCUUU-====C===A====CGUUACCCG
<i>Caulobacter henricii</i>	2	3	439	AAAUUCUUU-====C===A====CGUUACCCG
<i>Brevundimonas diminuta</i>	2	3	439	AAAUUCUUU-====C===A====CGUUACCCG
<i>Caulobacter segnis</i>	2	3	439	AAAUUCUUU-====C===A====CGUUACCCG
<i>Caulobacter vibrioides</i>	2	3	439	AAAUUCUUU-====C===A====CGUUACCCG
<i>Phenyllobacterium immobile</i>	2	3	439	AAAUACUUU-====A===A====CGGUACCCG

Tab. 4.4: Liste der ähnlichsten Bakteriensequenzen der Sonde Ax23-200

Name	mis	wmis	pos. ecoli	'GGCCTCTCGTAGAAGCTAC'
<i>Leptospirillum ferrooxidans 1</i>	3	3,7	200	GGAAAGGGA-====G===C====U--CGCUCCUGG
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	5	3,6	1542	GUCUGGAAC-====G=====g=G=ga-GAAUCCCGU
<i>Rhodococcus fascians</i>	5	3,6	1542	GUCUGGAAC-====G=====g=G=ga-GAAUCCCGU
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	5	4,9	68	AGUCGAGCG-==Gu=a=====UG-CUUCUAUUAU
<i>Haloarcula vallismortis</i>	5	5,0	628	CAACUGGUC-===G==CG==g===A====ACAGCUUGG
<i>Haloarcula argentinensis</i>	5	5,0	628	CAACUGGUC-===G==CG==g===A====ACAGCUUGG
<i>Haloarcula marismortui</i>	5	5,0	628	CAACUGGUC-===G==CG==g===A====ACAGCUUGG
<i>Halorubrobacterium lacusprofundi</i>	5	5,0	628	CAACGGGUC-===G==CG=====A==g--ACAGCUUGG
<i>Leptospirillum ferrooxidans 2</i>	5	5,8	200	GGAAAGGGA-====GA==C====Uu-CGCCUUAAG
<i>Ectothiorhodospira halochloris</i>	5	6,2	200	GGGAAAGUG-====NA=UC====Ca-CGVVGANNN

4.6 Isolierbare pilzliche Diversität ausgewählter mediterraner Schwämme

4.6.1 Hyphenpilze

Aus den verschiedenen untersuchten Schwammarten des Mittelmeeres konnte eine große Zahl an Pilzisolaten gewonnen werden. Diese gehörten überwiegend zu den in terrestrischen Habitaten verbreiteten Gattungen *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma* und *Verticillium*. Ein Teil der Pilze blieb auf den gewählten Medien steril und konnte somit durch morphologische Methoden nicht näher charakterisiert werden. Es wurden verschiedene Hefen isoliert, die taxonomisch nicht weiter bearbeitet wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Farbe und Oberflächenbeschaffenheit der Kolonien ließen sich aber verschiedene Morphotypen voneinander trennen. Aus den Wasser- und Sedimentproben aus der direkten Nachbarschaft der Schwämme, wurden neben den aus ihnen isolierten Pilzen noch weitere Arten isoliert. Die wenigsten Pilze ließen sich aus den Schwämmen *Oscarella lobularis* und *Haliclona valliculata* isolieren, die meisten aus *Leuconia aspera* (Abb. 4.29). Eine Korrelation zwischen der Zahl der Isolate und der Entfernung der Probenorte von der Küste und ihrer Wassertiefe konnte nicht gemacht werden. Es wurden ausschließlich verschiedene Seewassermedien für die Pilzisolierung verwendet, da Pilze selektiv kultiviert werden sollten, die auch in entsprechendem Milieu wachsen und somit auch tatsächlich in dem marinen Lebensraum existieren können.

Bei den Laborkontrollen zur Erfassung von Luftkeimen während der Pilz-Isolation und Kultivierung wurden nur sehr vereinzelt Pilze nachgewiesen, so dass die erhaltenen Pilze aus den Schwammproben selber stammten.

Die Sterilisierungsansätze des Schwammgewebes mit Na-Hypochlorid-Lösung oder Ethanol vor der Isolation erbrachten keine besondere Selektion von eventuell assoziierten Pilzen. Wenn Pilze auftraten, dann waren es die gleichen Arten wie bei den Ansätzen ohne Sterilisation. Die Sterilisierung bewirkte aber eine deutliche Reduzierung an Pilzisolierungen. Nach einer mehrminütigen Sterilisation konnten keine Pilze mehr aus den Gewebeproben isoliert werden.

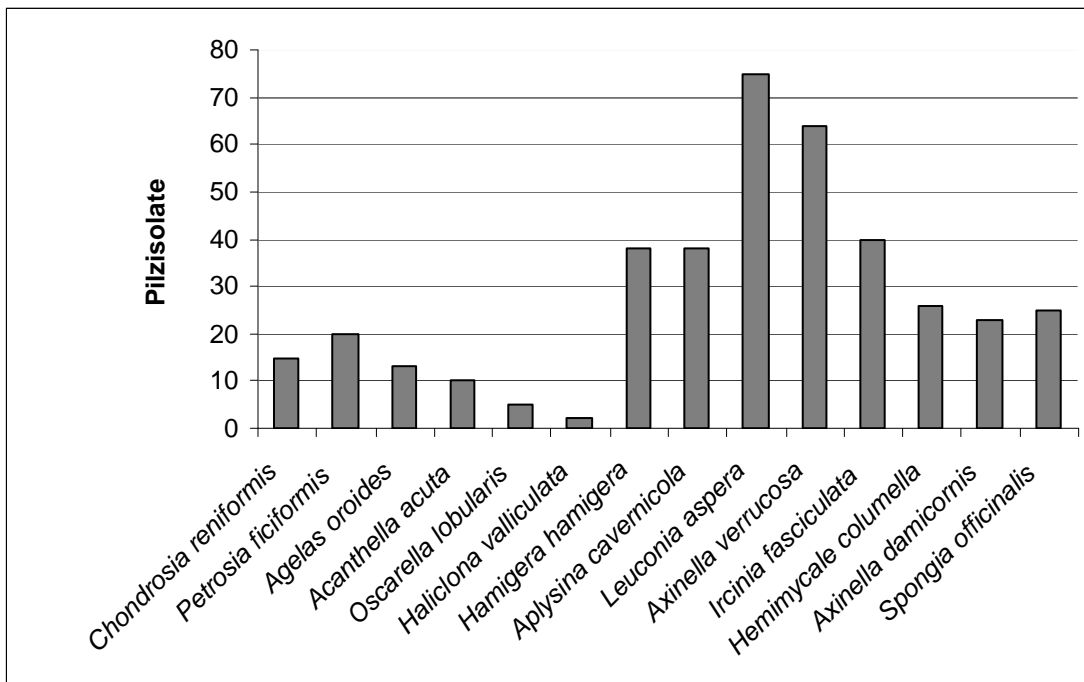


Abb. 4.29: Vergleich der kultivierten Pilzisolat aus verschiedenen Schwammarten vor Elba (2000).

4.6.2 Pilzähnliche Protisten

Pilzähnlichen Protisten (heterotrophe Chromista), die früher auch als „niedere Pilze“ bezeichnet wurden, konnten aus dem Schwammgewebe, dem Umgebungswasser und dem Sediment isoliert werden. Dabei traten Vertreter aus den drei obligat marinen Gattungen *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* und *Labyrinthula* auf (Labyrinthulomycota, Labyrinthulamycetes). Eine Gegenüberstellung der Isolationen aus dem Schwammgewebe und dem Umgebungswasser ist in Tab. 4.5 dargestellt. Im Standortwasser aus der direkten Umgebung der beprobten Schwämme waren, bis auf die *Hamigera hamigera*-Probe, regelmäßig Labyrinthulamyceten zu finden. Auch im Spülwasser (vgl. 3.2.1) traten regelmäßig pilzähnliche Protisten auf. Das aus den Schwammkanälen gepresste Wasser (Presswasser) wies noch einige Thraustochytrien auf. Dagegen konnten aus den Gewebeproben keine Labyrinthulamyceten isoliert und in Kultur genommen werden. Bei den homogenisierten Schwammproben ließen sich in einigen Proben noch pilzähnliche Protisten finden. Die Gegenüberstellung der verschiedenen Kultivierungsansätze zeigte, dass die Labyrinthulamyceten nicht eng mit den Schwämmen assoziiert waren und sich leicht aus den Schwämmen

auswaschen ließen. Es waren zudem die gleichen Arten, die sich auch im Umgebungswasser finden ließen.

Tab. 4.5: Isolierte pilzähnliche Protisten aus dem Umgebungswasser und verschiedenen mediterranen Schwammarten.

Schwammart	Spülwasser	Presswasser	Gewebe	Homogenisat	Standortwasser
<i>Ircinia fasciculata</i>	<i>Thraust.</i> , <i>Schizo.</i>				<i>Thraust.</i>
<i>Chondrosia reniformis</i>	<i>Thraust.</i> , <i>Schizo.</i>			<i>Thraust.</i>	<i>Thraust.</i> , <i>Schizo.</i>
<i>Axinella damicornis</i>	<i>Schizo.</i>	<i>Thraust.</i>		<i>Thraust.</i>	<i>Thraust.</i> , <i>Schizo.</i>
<i>Agelas oroides</i>	<i>Thraust.</i>	<i>Thraust.</i>		<i>Thraust.</i>	<i>Thraust.</i>
<i>Acanthella acuta</i>	<i>Thraust.</i>	<i>Thraust.</i>			<i>Thraust.</i>
<i>Spongia officinalis</i>	<i>Thraust.</i>	<i>Thraust.</i>			<i>Thraust.</i>
<i>Hamigera hamigera</i>	<i>Thraust.</i>			<i>Thraust.</i>	
<i>Petrosia ficiformis</i>	<i>Thraust.</i> , <i>Schizo.</i>			<i>Schizo.</i>	<i>Thraust.</i> , <i>Schizo.</i> , <i>Laby.</i>

Thraust.: *Thraustochytrium* spp.

Schizo.: *Schizochytrium aggregatum*

Laby.: *Labyrinthula* spp.

4.6.3 Neue Sekundärmetabolite aus schwammisolierten Pilzen

Einige der isolierten Pilzstämmen wurden mit Hilfe von Kooperationspartnern auf ihre Sekundärmetabolite hin untersucht. Die aufgeführten Beispiele erfolgten in Zusammenarbeit mit Gerhard Lang aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bringmann, Universität Würzburg.

Der Ascomycet *Emericella varicolor*, isoliert aus dem Schwamm *Haliclona valliculata*, produzierte nach Anzucht auf Wickerham Flüssigmedium die bereits bekannten Verbindungen Stromemycin, Shimixanthon und 7-Hydroxyemodin. Zusätzlich konnten die zwei bisher nicht beschriebene Metabolite Evariquinone und Isoemicellin nachgewiesen werden (Bringmann et al. 2003a).

Aus *Chondrosia reniformis*, *Ircinia fasciculata* und *Ircinia* sp. wurden mehrere *Penicillium chrysogenum* Stämme isoliert, die unter anderem Sorbicillacton-A, -B, -C und -D, einige neuartige Alkaloide produzierten. Kultivierungsexperimente mit Medien verschiedener Salinität zeigten, dass die Produktion der Sorbicillactone salzabhängig war. Bei NaCl-Konzentrationen von 10-30‰ fiel die Sorbicillacton A- und B-Produk-

tion höher aus als bei der Kultivierung der Pilze auf Leitungswassermedien, wo Sorbicillacton-A gar nicht mehr produziert wurde. Die Sorbicillacton-B Konzentration stieg stetig mit der Erhöhung der Salinität. Im Gegensatz dazu wurden Sorbicillacton-C und -D besonders bei der Kultivierung der *P. chrysogenum* Isolate auf Leitungswassermedium gebildet und ihre Produktion war bei einer Salinität von 10‰ schon stark reduziert (Abb. 4.30, Bringmann et al. 2003b).

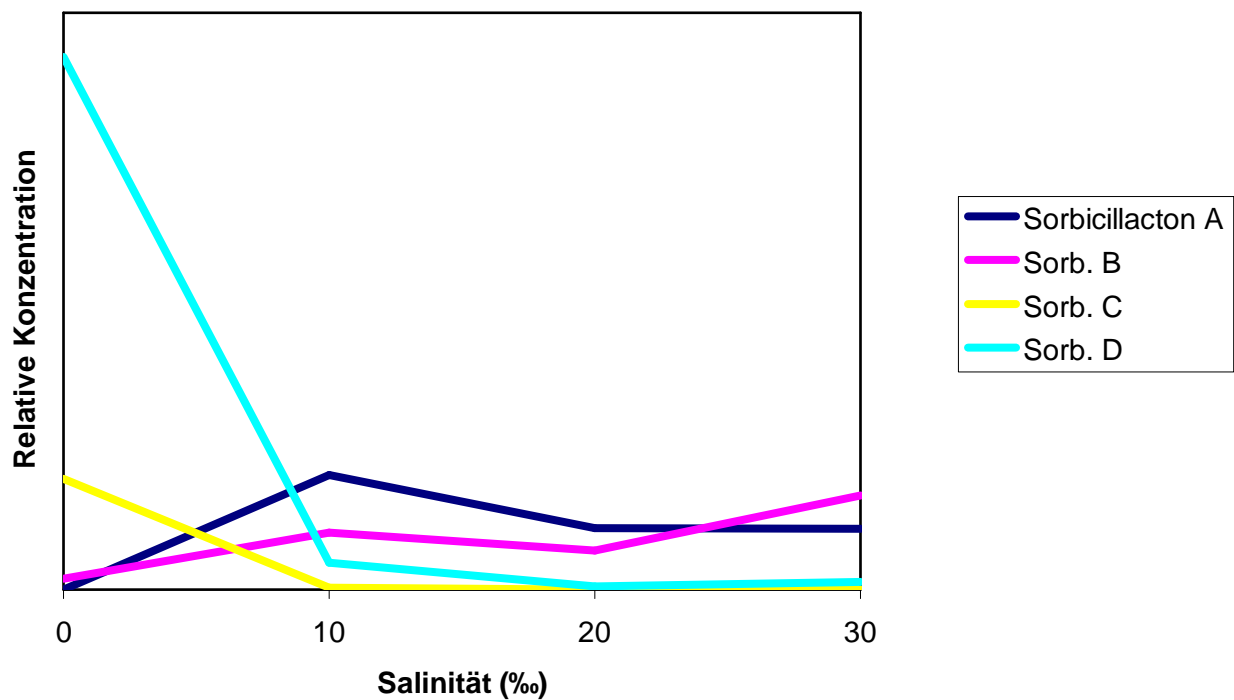


Abb. 4.30: Kultivierungsansatz von *Penicillium chrysogenum* bei verschiedenen Salinitäten des Mediums und der davon abhängigen Sekundärmetabolitproduktion.

5 Diskussion

5.1 Mikrobielle Epi- und Endobionten verschiedener Schwammspezies

5.1.1 Mikrobielle Besiedlung der Schwammoberfläche

Alle Oberflächen im Meer sind der Besiedlung von Mikroorganismen und anderer Epibionten ausgesetzt (Becerro et al. 1994). Nach einer Anlagerung von Makromolekülen sind die Bakterien meist die ersten Organismen, die sich an diesen Flächen etablieren können und die Basis für die weitere Besiedlung durch Eukaryoten schaffen (Wahl 1989). Sie scheiden eine Matrix aus schleimigen extrazellulären Polymeren aus, in der sie immobilisiert werden und die ihnen ein geschütztes Habitat bietet (Decho 2000).

Die Oberflächen der untersuchten Kieselschwämme waren bakterienfrei oder nur vereinzelt mit Mikroorganismen besiedelt. Dies weist auf kolonisierungshemmende Mechanismen der untersuchten Kieselschwämme hin, so dass kein Bakterienfilm aufgebaut werden kann. Andererseits ist ein bakterieller Film nicht immer die Bedingung für eine weitere Besiedlung (Bakus et al. 1990), so zeigten die untersuchten *Axinella verrucosa* und *A. damicornis* eine bakterienfreie Oberfläche, waren aber regelmäßig von der Krustenanemone *Parazoanthus axinellae* besiedelt.

Schwämme besitzen verschiedene Mechanismen gegen den Oberflächenbewuchs. Neben dem Aufbau schützender Schleimschichten, kann die äußerste Gewebeschicht periodisch abgelöst oder auch eine große Anzahl an bioaktiven Substanzen als Antifoulingschutz freigesetzt werden (Thompson et al. 1985, Barthel und Wolfrath 1989, Assmann et al. 2000). Dabei ist die chemische Verteidigung die wirksamste Waffe der Schwämme gegen eine Besiedlung.

Der mögliche Schutz durch Antifouling-Substanzen ist nicht immer konstant, da die Sekundärmetabolitenproduktion durch die Standortbedingungen, den Fraßdruck, das Alter oder andere intraindividuelle Variabilitäten beeinflusst wird (Thompson et al. 1985, Becerro et al. 1994). *Axinella verrucosa* und *Chondrosia reniformis* zeigten bei den vorliegenden Untersuchungen eine bakterienfreie Schwammoberfläche, was zuvor bereits von *Crambe crambe* beschrieben wurde (Becerro et al. 1994). Bei diesen Untersuchungen zeigte *Ircinia fasciculata* einen ausgeprägten Bewuchs mit Bakteri-

en und Algen, wohingegen diese Art bei den eigenen Untersuchungen zwar Algen aber nur eine geringe bakterielle Besiedlung aufwies. Tsoukatou et al. (2001) haben verschiedene antibakterielle Verbindungen aus mehreren mediterranen *Ircinia*-Arten isoliert, was für eine gute chemische Verteidigung der Vertreter der Gattung spricht. Allerdings ist über die biologische Wirkung der antibakteriellen Substanzen der Schwämme am Standort erst wenig bekannt, da der Großteil der Tests mit terrestrischen oder humanpathogenen Bakterien durchgeführt wurde und nicht mit solchen aus dem gleichen Lebensraum (Bergquist und Bedford 1978, Bakus et al. 1990).

McCaffrey und Endean (1985) und Thompson et al. (1985) beschreiben, dass Schwämme mit antibakteriellen Eigenschaften generell frei von Aufwuchs sind. Bergquist und Bedford (1978) fanden, dass Gram negative Bakterien von Schwämmen besonders inhibiert wurden, Amade et al. (1982) beschrieben eine gleichgroße Unterdrückung von Gram positiven Bakterien.

Im Gegensatz zu den Kieselschwämmen, wiesen die untersuchten Kalkschwämme *Sycon raphanus* und *Leuconia aspera* einen dichten Besatz mit Mikroorganismen und Algen auf. Aus den Calcarea konnten bisher auch nur in deutlich geringerem Maße antibiotische Substanzen nachgewiesen werden (Schmitz 1994, Kelecom 2002), was für einen geringeren Antifoulingsschutz spricht. Nur hier konnten die einzigen potentiellen Pilzstrukturen auf der Schwammoberfläche aufgezeigt werden.

5.1.2 Mikrobielle Besiedlung des Schwammgewebes

Die Beobachtungen im Gewebe der ausgewählten systematisch und morphologisch verschiedenen Schwämme zeigten artspezifische Unterschiede in ihrer bakteriellen Besiedlung. Sie ließen sich in zwei Gruppen aufteilen, auf der einen Seite die Arten mit mehreren verschiedenen Bakterientypen und einem dichten Mesohyl und auf der anderen Seite die Schwämme mit einem eher locker strukturierten Interzellularräum, in dem nur ein oder wenige Bakterientypen vorkamen. Diese Unterschiede fanden auch Vacelet und Donadey (1977) bei den von ihnen untersuchten Schwämmen, so dass die Morphologie einen grundlegenden Einfluss auf die mikrobielle Besiedlung ausübt.

In *Chondrosia reniformis*, *Agelas oroides*, *Ircinia variabilis* und *Spirastrella cunctatrix* kamen ähnliche Bakterien vor, deren übereinstimmende Arten man als potentielle Bakterien des Umgebungswasser deuten kann. Andererseits wurden aber schon phänotypisch gleiche Bakterien in verschiedenen Schwammarten nachgewiesen, die nicht mit den Arten des Umgebungswasser übereinstimmten, aber sowohl in mediterranen als auch in Schwämmen vom Great Barrier Reef nachgewiesen wurden (Wilkinson et al. 1981). Die Aussagefähigkeit von reinen morphologisch-taxonomischen Vergleichen ist allerdings limitiert. Grabowski (2002) fand hingegen, mit molekularbiologischen Methoden, die gleichen Actinomyceten sowohl im Schwamm *Halichondria panicea* als auch im Umgebungswasser.

Müller et al. (1981) beschrieben Lectine aus dem Schwamm *Halichondria panicea*, die eine wachstumsfördernde Wirkung auf aus den Schwämmen isolierte Bakterien ausübten. Sie schlossen daraus, dass sie für die spezifische Assoziation von Bakterien mit bestimmten Schwämmen verantwortlich sein könnten. Ein solches System könnte bei den intrazellulären Bakterien der untersuchten Schwämme *Axinella verrucosa*, *Acanthella acuta*, *Anchinoe tenacior* und *Clathrina clathrus* wirken. In ihnen konnten sich nur wenige Bakterientypen etablieren.

Mehrere der in den mediterranen Schwammproben nachgewiesenen Bakterientypen wurden zuvor schon aus denselben Schwammarten beschrieben. So stimmen einige Morphotypen in *Agelas oroides* mit Beschreibungen aus *A. oroides* vor Marseille überein (Vacelet und Donadey 1977). Sarà et al. (1973) fanden hingegen nur einen Bakterientyp in der Schwammart. Die in den Elba-Proben beobachteten intrazellulären Vakuolen, die im Vergleich zum Mesohyl unterschiedliche Bakterientypen besaßen, wurden jedoch nicht erwähnt. Vacelet und Donadey (1977) haben auch in *Acanthella acuta* und *Axinella damicornis* nur vereinzelte Bakterien im Mesohyl gefunden. Sie beschrieben jedoch keine bakteriengefüllten intrazellulären Vakuolen und filamentbildenden Bakterien im Sponginskelett, wie bei den hier präsentierten Untersuchungen. Die Beschreibungen der Mesohylbakterien aus *Axinella damicornis* stimmen mit denen der Elba-Proben überein. Über die mikrobiellen Endobionten von *Spirastrella cunctatrix* und *Anchinoe tenacior* gab es bisher keine ultrastrukturellen Untersuchungen.

Besonders auffällig sind die spirillenförmigen Bakterien in *C. clathrus*. In den untersuchten *Chondrosia reniformis*, *Acanthella acuta*, *Axinella verrucosa* und *Agelas*

oroides vom selben Standort konnten dagegen keine spirillenförmigen Bakterien im Mesohyl nachgewiesen werden. Das weist auf eine spezifische Selektion dieses Bakterientyps durch den Schwamm hin, so dass eine Assoziation zwischen den Bakterien und dem Schwamm sehr wahrscheinlich ist. Sarà et al. (1973) und Burlando et al. (1988) fanden konstant spirillenförmige Bakterien in *Clathrina cerebrum* und in einigen *C. clathrus* Spezies an der französischen Mittelmeerküste. Es ist erstaunlich, dass dieser Bakterientyp in verschiedenen Schwammarten einer Gattung dominiert. Bei *Chondrosia reniformis* befand sich der Großteil der Bakterien im Bereich der Kraengeißelkammern, am Hauptort der Bakterienaufnahme ins Schwammgewebe, an dem eine gute Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Wasser vorliegt (Hartman 1983). Die Schwämme sind im Vergleich zur Umgebung sehr nährstoffreich, sie konzentrieren organische Verbindungen aus der Wassersäule und liefern stickstoffhaltige Exkretionsprodukte, die von den Bakterien genutzt werden können (Santavy und Colwell 1990). Als Anpassung an diesen Lebensraum können die schwammassoziierten Bakterien eine große Bandbreite an verschiedenen Substraten umsetzen (Santavy et al. 1990). Schwämme beherbergen nicht nur eine eigene mikrobielle Gemeinschaft, sie beeinflussen auch die Bakterienzusammensetzung im umgebenden Sediment (Soltwedel und Vopel 2001).

In den bakterienreichen Schwammarten *Chondrosia reniformis*, *Agelas oroides*, *Ircinia fasciculata* und *Spirastrella cunctatrix* traten deutlich häufiger phagozytierte Bakterien in den Schwammzellen auf, wie dies auch Vacelet und Donadey (1977) bei ihren Untersuchungen beschrieben. Diese Bakterien entsprachen den Arten des Mesohyls und schienen eine bedeutende Nahrungsquelle der Schwammzellen zu sein. Dagegen waren bei *Axinella verrucosa*, *Acanthella acuta*, *Agelas oroides* und *Anchinoe tenacior* nur vereinzelt Bakterien im Mesohyl zu finden, die auch seltener in Nahrungsvakuolen der Archäocyten nachweisbar waren. Wilkinson et al. (1984) beschrieben die Fähigkeit der Schwämme zwischen Nahrungsbakterien und Symbionten unterscheiden zu können. Sie fanden Bakterien mit Schleimkapseln nie in Phagosomen und postulierten deshalb, dass diese Kapseln einen Schutz vor ihrem Verdau darstellen. Friedrich et al. (1999) berichteten vom gleichen Phänomen beim Schwamm *Aplysina cavernicola*. Tatsächlich bilden verschiedene pathogene Mikroorganismen Schleimkapseln, die eine Anheftung an den Wirt fördern oder auch das Erkennen der Bakterien durch phagozytierende Zellen des Immunsystems verhin-

dern (Madigan et al. 2000). Bakterien mit einer Schleimkapsel (vgl. 4.1.2, Typ A) traten auch in verschiedenen der hier untersuchten Schwämmen auf. Diese wurden aber ebenfalls von den Schwammzellen aufgenommen und verdaut. Die gefundene Teilungsaktivität der Bakterien im Schwammgewebe zeigt an, dass diese physiologisch aktiv waren.

Symbiontische Mikroorganismen werden als vorteilhaft für den Schwamm angesehen, wie diese aber ihre Anzahl kontrollieren ist noch unbekannt (Rützler 1988). Gegen nicht symbiontische Bakterien und andere Eindringlinge können sich Schwämme durch Phagozytose durch die Archäocyten oder die Bildung von kollagenen Barrieren und Kapseln schützen (Cheng et al. 1968a, 1968b). Seit einiger Zeit ist schon eine Zellkommunikation zwischen Bakterien, das sogenannte „quorum sensing“ bekannt, das unter anderem an der Etablierung von Bakterienfilmen beteiligt ist (Whithead et al. 2001). Joint et al. (2002) konnten erstmals zeigen, dass ein solches System auch zwischen Prokaryoten und Eukaryoten existiert. Für die Symbiosen bei Schwämmen könnte ein solches System die Selektierung und Proliferation der Bakterien im Schwammgewebe steuern.

Wie zuvor berichtet (vgl. 5.1.1), bilden viele Schwämme antibiotische Metabolite gegen den Bewuchs ihrer Oberflächen. Aus Kalkschwämmen, wie *C. clathrus*, sind bisher wenige chemische Abwehrmechanismen beschrieben worden (Kelecom 2002), trotzdem kommt es hier zu einer deutlichen Selektion bei den Spirillen im Mesohyl.

Trotz der meist bakterienfreien Oberfläche der untersuchten Schwämme sind im Mesohyl verschiedene Bakterienarten zu finden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Bakterien entweder resistent gegen die chemischen Abwehrmechanismen der Schwämme sind oder die biologisch aktiven Stoffe nur an der Schwammoberfläche freigesetzt werden. Die Produktion von toxischen Substanzen und ihre Abgabe an das Außenmedium wurde mehrfach gezeigt. Meist sind die „spherulous cells“ daran beteiligt, die im Ektosom nahe der Schwammoberfläche und am Oscularrohr, der Ausströmöffnung des Kanalsystems, zu finden sind (Bergquist 1978, Walker et al. 1985, Becerro et al. 1997, Gillor et al. 2000). Uriz et al. (1996) konnten bei *Crambe crambe* zeigen, dass die „spherulous cells“ an die Schwammoberfläche wandern und dort die Metabolite aus ihren Vakuolen entlassen. Andererseits wurde eine Sporenbildung von Bakterien im Mesohyl als Reaktion auf Abwehrmechanismen des Schwamms *Chondrilla nucula* beobachtet (Gaino und Pronzato 1987).

Im Schwammgewebe konnten weder Hyphenpilze noch Hefen oder pilzähnliche Protisten nachgewiesen werden. Allerdings waren Konidien im Gewebe, die den isolierten Pilzarten entsprechen und daher auch als Ursprung der isolierten Pilze angesehen werden können.

5.2 Bakterielle Endobionten von *Axinella verrucosa*

5.2.1 Bakterien des Mesohyls

Die wenigen und einheitlichen Bakterien des Mesohyls von *Axinella verrucosa* entsprechen den vorherigen Beschreibungen von *Axinella damicornis* (Vacelet und Donadey 1977). Dabei werden stabförmige Bakterien im Interzellularraum beschrieben, jedoch keine Bakterien im Spongin. Bei den eigenen Untersuchungen war die Besiedlung identisch. Sowohl bei den Schwammproben um Elba, als auch aus dem Atlantik vor Roscoff zeigten sich die gleichen Morphotypen. Dagegen beschrieben Margot et al. (2002) mit elektronenmikroskopischen Methoden eine große Diversität an Bakterien im Mesohyl von *A. verrucosa*, *A. damicornis* und *A. sp.* und finden keine Anzeichen für einen häufig oder regelmäßig vorkommenden Morphotyp im Mesohyl dieser Schwämme.

Die sonst nahe der Schwammoberfläche auftretenden „spherulous cells“ waren bei den Untersuchungen von *A. verrucosa* auch regelmäßig im Mesohyl zu finden. Damit könnte die Freisetzung der Metabolite aus diesen Zellen für die beobachtete geringe Bakterienzahl im gesamten Schwammgewebe verantwortlich sein.

Die Bakterien des Mesohyls sind offensichtlich nicht in der Lage das Spongin, wie das fädige Bakterium, zu durchwachsen. Sie waren in keinem der untersuchten Schwämme darin nachzuweisen und zeigten bei den enzymhistochemischen Untersuchungen keine Kollagenaseaktivität.

5.2.2 Filamentbildendes α -Proteobakterium im Sponginskelett

Mikroorganismen wurden zuvor schon im Spongium verschiedener Schwammarten nachgewiesen (Rützler 1988, Gaino und Pronzato 1989, Gaino et al. 1992, Vacelet et al. 1994, Margot et al. 2002). Dabei stammen die meisten Beschreibungen von verschiedenen Schwammepidemien im Mittelmeer und in der Karibik (Smith 1941, Gaino und Pronzato 1989, Gaino et al. 1992, Vacelet et al. 1994). Die Ursache dafür waren einzellige Bakterien, die das Spongium durchwuchsen und leere Kanäle darin zurückließen. Besonders betroffen waren die kommerziell genutzten Schwammgattungen *Spongia* und *Hippospongia*, was den Schwammfischern große finanzielle Einbußen erbrachte. Von dem bakteriellen Befall waren aber auch andere Arten wie *Petrosia ficiformis*, *Ircinia variabilis* und *Anchinoe paupertas* betroffen (Smith 1941, Gaino und Pronzato 1989, Gaino et al. 1992).

Die Erkrankung begann mit der Ausbildung eines hellen Bakterienfilms auf der Schwammoberfläche, gefolgt vom Befall des Spongiums, in dessen Folge das Schwammgewebe aufgelöst wurde. Bei einigen untersuchten *Agelas oroides* und *Ircinia* Proben kam es dabei nur zu einer Invasion des Spongiums und nicht zur Auflösung des umgebenden Gewebes (Lauckner 1980, Vacelet et al. 1994). Die betroffenen Schwämme konnten durch Abkapselung des betroffenen Gewebes bei nicht zu starkem Befall regenerieren (Gaino et al. 1992). Dabei ist nicht klar, ob die Spongium durchbohrenden Bakterien stark proliferierende Symbionten darstellten, wie es für symbiontischen Cyanobakterien im Schwamm *Geodia papyracea* nachgewiesen wurde (Rützler 1988) oder es sich um Arten handelte, die den Schwamm neu befallen haben (Gaino und Pronzato 1989).

Webster et al. (2002) konnten ein Spongium durchbohrendes Bakterium isolieren und es als α -Proteobakterium bestimmen. Nach der Infektion von gesunden Schwämmen mit dem Bakterium befielen diese das Spongium, wobei leere Gänge darin zurückblieben. Das α -Proteobakterium zeigte auch in vitro eine Kollagenaseaktivität.

Auffällig an den Schwammerkrankungen im Mittelmeer und der Karibik war, dass nur Schwämme bis zu einer Wassertiefe von 30-40m betroffen waren, woraus auf eine erhöhte Wassertemperatur als Auslöser der Epidemien geschlossen wurde (Vicente 1989, Peters 1993). Hummel et al. (1988) zeigten, dass eine erhöhte Temperatur und niedrigere Fließgeschwindigkeit des Wassers zu einer Invasion von Bakterien

aus dem umliegenden Sediment und Umgebungswasser in *Halichondria panicea* führte, die vorher nicht im Gewebe gefunden wurden. Im Sommer 1999 gab es aufgrund außergewöhnlich hoher Wassertemperaturen ein Massensterben von Invertebraten zwischen der Küste vor Marseille bis hin zur Insel Elba, bei dem die betroffenen Schwämme innerhalb von zwei Tagen starben und nur noch das Sponginskelett übrig blieb (Perez et al. 2000).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Schwämme mit bakteriellen Sponginbesiedlern zeigten jedoch keine Anzeichen einer Erkrankung. Sie wiesen weder Löcher im Spongin, noch ein geschädigtes Gewebe oder Bakterienfilme auf der Schwammoberfläche auf. Zudem zeigten sowohl die morphologischen als auch die molekularbiologischen Untersuchungen mit SSCP, dass der Bakterienbesatz der untersuchten Exemplare von *A. verrucosa* sowohl an den verschiedenen Mittelmeerstandorten um die Inseln Elba und Giglio, als auch bei den Atlantikproben vor Roscoff konstant waren, was ebenfalls gegen eine lokale Erkrankung der *Axinella verrucosa* Populationen spricht. Obwohl die Küste um Elba stark vom Invertebratensterben im Jahr 1999 betroffen war (Perez et al. 2000, C. Lott und A. Spohr, Institut für Meereswissenschaften „Hydra“ auf Elba, persönliche Mitteilung) stellt die hier gefundene Besiedlung von *A. verrucosa*, sowie *A. damicornis*, *Agelas oroides*, *Acanthella acuta* und *Anchinoe tenacior* offensichtlich keine Erkrankung dar, da dieses Phänomen über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht wurde, ohne eine Beeinträchtigung der Schwämme nachweisen zu können. Übereinstimmende Mikroorganismen im Spongin, die keinen negativen Einfluss auf die Schwämme ausübten, wurden auch in verschiedenen *Axinella*-Arten an der spanischen Mittelmeerküste gefunden (Margot et al. 2002).

Der Hälterungsansatz von *Axinella verrucosa* bei erhöhten Wassertemperaturen führte weder zu einer Ausbreitung der Bakterien im Spongin, noch zu einem Übergreifen auf das benachbarte Gewebe und dessen Zerstörung. Dies spricht ebenfalls gegen eine pathogene bakterielle Besiedlung. *Axinella damicornis*, der bei den Untersuchungen auch das filamentöse Bakterium im Spongin aufwies, ist ein schlecht kultivierbarer Schwamm mit einer sehr geringen Regenerationsfähigkeit (Pronzato et al. 1999). Ein pathogener Befall würde sich somit sehr schnell im gestörten Aufbau des Gewebes widerspiegeln. Dies wurde nicht beobachtet.

Filamentbildende Mikroorganismen wurden bei einer karibischen Schwammepidemie im Übergangsbereich vom geschädigten zum intakten Gewebe gefunden, wobei sie häufig büschelartig auf dem Spongium vorkamen. Die Organismen konnten nicht zweifelsfrei taxonomisch eingeordnet werden, wurden dann aber als Pilze beschrieben (Dosse 1940, Smith 1941). Im Spongium von *Mycale laxissima* kommen die fadenförmigen Algen *Ostreobium cf. constrictum* und *Acrochaetium spongicolum* vor. Sie lösen dort aber nicht das Spongium auf, wie die oben genannten Bakterien und das filamentbildende Bakterium in *Axinella verrucosa*, sondern drücken die Kollagenfasern zum Durchwachsen auseinander (Rützler 1988). Margot et al. (2002), die ebenfalls fädige Bakterien in verschiedenen *Axinella*-Arten fanden, konnten sie jedoch nicht in einem der weiteren untersuchten 15 Schwammarten nachweisen.

Es gibt zwei Arten von Schwammkollagen: erstens das filamentöse Kollagen des Mesohyls, das dem Kollagen der Basalmembranen bei Säugetieren sehr ähnlich ist und zweitens das faserbildende Kollagen des Spongiums (Bergquist 1978, Simpson 1984, Boute et al. 1996). Das Kollagen enthält neben verschiedenen Sacchariden und Schwefelverbindungen eine Vielzahl an Aminosäuren, wobei der Gehalt von Art zu Art variiert, Glycin und Glutaminsäure aber häufig den größten Anteil stellen (Roche und Eysseric-Lafon 1951, Gross et al. 1956, Swatschek et al. 2002). Das Spongium ist sehr proteaseresistent und unempfindlich gegen Trypsin, Pepsin und Kollagenasen und lässt sich nur schwer durch Säuren lösen (Junqua et al. 1974, Garrone 1978). Bei einigen humanpathogenen Bakterien wurde eine Kollagenase-Bildung nachgewiesen. Diese Mikroorganismen sind oft anaerob und können sich dieses sauerstoffarme Milieu auch selber schaffen (Shimizu et al. 2002). Einige davon, wie *Bacillus subtilis*, weisen eine hohe Salztoleranz oder eine dunkle Pigmentierung auf, wie sie auch die Spongiumbakterien in *A. verrucosa* zeigten. Andere sind auf die Aufnahme von Aminosäuren angewiesen, die auch im Schwamm-Spongium verfügbar sind (Harrington 1996, Tran und Nagano 2002). Wilkinson et al. (1979) beschrieben eine anaerobe Kollagendigestion einiger Bakterien aus verschiedenen Schwammarten. Die von ihnen parallel aus dem Umgebungswasser isolierten Bakterien besaßen diese Fähigkeit nicht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen lokale Kollagen-Auflösung der Bakterien in *Chondrosia reniformis* fanden auch Wilkinson et

al. (1979). Die Autoren konnten den schwammeigenen Bakterien eine Funktion beim Kollagenrecycling und Umbau des Schwammgewebes zusprechen.

Die Kathepsin B-Markierung zeigte, dass auch das fädige Bakterium im Spongin von *Axinella verrucosa* eine Kollagenaseaktivität besitzt. *Streptococcus pyogenes* produziert einen Virulenzfaktor mit einer großen Ähnlichkeit zu Kathepsin B (Kagawa et al. 2000). Andere Virulenzfaktoren bewirken eine Anlagerung von fibrinösem Material auf invasiven Mikroorganismen und schützen diese somit vor Angriffen durch Wirtszellen (Madigan et al. 2000). Ein solcher Mechanismus könnte ebenfalls den Sponginbakterien einen geschützten Lebensraum innerhalb des Schwammskeletts bieten.

Die filamentbildenden Sponginbakterien konnten mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung als α -Proteobakterien bestimmt werden. Mit den generierten spezifischen Sonden ließen sie sich als eines der klonierten Bakterien aus dem Schwamm nachweisen. Alpha-Proteobakterien wurden schon aus einigen Schwammarten isoliert (Burja und Hill 2001, Hentschel et al. 2001). Bei *Rhopaloeides odorabile* machte ein α -Proteobakterium annähernd 100% der isolierbaren Bakterien aus, das empfindlich auf Störungen des Schwammwirtes reagierte (Webster et al. 2001b, Webster und Hill 2001). Althoff et al. (1998) fanden ein symbiontisches Bakterium der Gattung *Rhodobacter* in *Halichondria panicea* aus der Nord- und Ostsee sowie dem Mittelmeer. Vergleichbar verbreitet war auch das Vorkommen des Sponginbakteriums, dessen Sequenzen sowohl in den Atlantik- als auch den Mittelmeerproben nachgewiesen werden konnte. Aus zwei verschiedenen Tiefseeschwämmen wurde ein verzweigtes fadenbildendes α -Proteobakterium isoliert, dessen 16S rRNA Sequenz sich aber deutlich von der des Sponginbakteriums unterscheidet (Olson et al. 2002). Die α -Proteobakterien aus verschiedenen Schwammarten gruppieren sich aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten in phylogenetischen Stammbäumen in deutlichen Clustern (Hentschel et al. 2001, Webster und Hill 2001, Olson et al. 2002). Das aus *Axinella verrucosa* nachgewiesene Bakterium besitzt dagegen einen deutlich größeren Sequenzunterschied zu den bisher beschriebenen α -Proteobakterien aus anderen Schwammproben. Die nächste Verwandtschaft mit dem *A. verrucosa*-Klon besitzt ein planktisches Bakterium aus der Ägäis, das allerdings nur eine Übereinstimmung der 16S rRNA von unter 88% besitzt (Moeseneder et al. 2001). Die α -Proteobakterien sind die dominierende Gruppe im Plankton der Ozeane (Cottrell und Kirchmann

2000, Morris et al. 2002), auch im Küstenbereich stellen sie die größte Gruppe mit einem Anteil von bis zu 40%, wobei ihr Anteil mit zunehmender Wassertiefe abnimmt (González und Moran 1997, Acinas et al. 1999, Rappé et al. 2000).

Erpenbeck et al. (2002) haben anhand des mitochondrialen Cytochromoxidase Gens die Stammbäume von halichondriden Schwämmen und ihren assoziierten α -Proteobakterien miteinander verglichen. Dabei konnte der Status der *A. verrucosa* Symbionten nicht aufgelöst werden, aber *A. damicornis* zeigte eine koevolutionäre Entwicklung zwischen den Bakterien und Schwämmen. Solche Parallelentwicklungen von α -Proteobakterien mit ihren Wirtsorganismen konnten zuvor schon bei Algen und Nematoden gezeigt werden (Ashen und Goff 2000, Casiraghi et al. 2001).

Die aus prokaryotischen Symbionten hervorgegangenen Mitochondrien sind am nächsten mit den Proteobakterien verwandt. Einige von diesen, wie α -Proteobakterien der Gattung *Agrobacterium*, sind selbst zu einem intrazellulären Leben in der Lage (Madigan et al. 2000). Da Schwämme eine lange evolutionäre Entwicklung mit vielfachen symbiontischen Interaktionen besitzen, können sie eine Nische für evolutionär alte Bakterien bieten (Hentschel et al. 2002). Die deutliche genetische Entfernung der gefundenen Sponginbakterien zu den nächstverwandten Bakterien, kann das Resultat einer frühen phylogenetischen Abspaltung und langen isolierten Entwicklung im Schwamm sein.

Kernmembranen sind das klassische Unterscheidungskriterium zwischen Pro- und Eukaryoten. Außer bei den Planctomyceten und einigen Gram positiven Bakterien bei der Endosporenbildung innerhalb der Mutterzelle, besitzen Bakterien und Archaeobakterien ein nicht kompartimentiertes Nucleotid ohne eine abgrenzende Membran (Fuerst 1995, Fuerst et al. 1998, Strous et al. 1999). Lindsay et al. (1997) beschrieben kernartige Strukturen in der Planctomycetengattung *Pirellula*, für die sie den Namen Pirellusom prägten. Fuerst et al. (1998) beschrieben verschiedene Mikroorganismen mit membranumrandeter Kernregion im Gewebe von Schwämmen. Solche Strukturen besitzen auch die gefundenen fädigen Sponginbakterien der untersuchten *Axinella*-, *Agelas*- und *Acanthella*-Spezies. Die Intrazytoplasmatische Membran (ICM) trennt den zentralen Zellbereich der Bakterien mit dem fädigen Nucleotid vom restlichen Zytoplasma ab. Das so getrennte innere und äußere Zytoplasma zeigte auch eine unterschiedlich starke Granulierung bei den untersuchten

Bakterien. Die ausschließliche Färbung der „Kernregion“ mit dem DNA-Farbstoff DAPI zeigt die trennende Wirkung der ICM. Die DNA ist nur im zentralen Bereich der Zellen zu finden. Bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung für die 16S rRNA war dagegen die gesamte Bakterienzelle markiert, da die Ribosomen auch jenseits der ICM vorkamen und nicht auf den zentralen Zellbereich beschränkt waren. Lindsay et al. (2001) wiesen immunhistochemisch ebenfalls die DNA nur im zentralen membranumrandeten Teil des Planctomyceten *Pirellula* nach. Sie fanden den überwiegenden Teil der RNA im inneren, in geringeren Konzentrationen aber auch regelmäßig im äußeren Zytoplasma. Fuerst et al. (1999) fanden eine Trennung von DNA und RNA durch die ICM in den von ihnen untersuchten Schwammendobionten. Die rRNA konnten sie ausschließlich im äußeren Zytoplasma nachweisen. Diese rRNA-Nachweise im äußeren Zytoplasma belegen eindeutig, dass es sich bei diesen Strukturen nicht um ein erweitertes Periplasma handelt, wie es zuvor von Gram negativen Bakterien aus verschiedenen Schwammarten beschrieben wurde (Wilkinson 1978c, Santavy et al. 1990, Friedrich et al. 1999). Fuerst et al. (1999) ordneten die von ihnen gefundenen Mikroorganismen nach morphologischen Gesichtspunkten den Archaeobakterien zu. Sie fanden diese aber weit verbreitet in verschiedenen Schwammspezies und gehen von keiner symbiontischen Beziehung zu den Schwämmen aus. Andere Nachweise von intrazellulären Membranen nichtphototropher Bakterien in Schwämmen stammen von methanotrophen und sporenbildenden Zellen, die sich aber deutlich von den hier gefundenen Bakterientypen unterscheiden (Gaino und Pronzato 1987, Vacelet et al. 1996). Die während der vorliegenden Arbeit untersuchten Sponginbakterien sind der erste Nachweis eines α -Proteobakteriums mit einer intrazytoplasmatischer Membran. Bisher konnte noch kein Bakterium, außer den Planctomyceten, mit diesen Strukturen taxonomisch eingeordnet werden.

5.2.3 Bakterien in Vakuolen der Schwammzellen

Zellen mit Bakterien gefüllten Vakuolen wurden zuvor aus *Petrosia ficiformis* beschrieben und aufgrund ihres regelmäßigen Auftretens als eigenständiger Zelltyp (Bakteriocyten) klassifiziert (Vacelet und Donadey 1977). Dabei waren die intrazellulären Bakterienvakuolen so groß, dass sie annähernd die gesamten Zellen ausfüllten. In Abhängigkeit von den Lichtbedingungen enthielten die Vakuolen verschiedene heterotrophe Bakterientypen aber auch Cyanobakterien. Die Bakterien in den Vakuolen zeigten Kontaktstellen mit der Vakuolenmembran, die bei Endobionten von Insekten als morphologische Basis für eine spezifische Assoziation mit dem Wirt interpretiert wurden (Bigliardi et al. 1993). Bakteriocyten kamen auch in den Schwämmen *Pericharax heteroraphis*, *Jaspis stellifera* und *Neofibularia irata* vor, in deren Vakuolen die Bakterien des Mesohyls wieder zu finden waren (Wilkinson 1978c).

Bei den eigenen Untersuchungen zeigten *Axinella verrucosa*, *Agelas oroides* und *Acanthella acuta* neben den Phagosomen oder Nahrungsvakuolen mit einzelnen Bakterien, Vakuolen mit einer Vielzahl an Bakterien. Auffällig daran war, dass sie nur einen Bakterientyp enthielten und dieser sich wie bei *Agelas oroides* deutlich von den Mesohylbakterien unterschied. Die hier gefundene Matrix in den Vakuolen, wurde bisher noch nicht beschrieben. Sciscioli et al. (1994) beschrieben Vakuolen der Oocyte von *Geodia cydonium* mit einem fibrillären Inhalt neben den Bakterien. Da Fixierungsartefakte nicht ausgeschlossen werden konnten, war der Zustand der Bakterien in den Vakuolen der untersuchten *A. verrucosa*-Proben nicht sicher bestimmbar. Die Vakuolen kamen aber sowohl in Zellen des Mesohyls als auch in den Oocyten vor, in denen sie in großen Dichten vorlagen.

Die Vakuolen enthaltenen Zellen wurden von anderen Zellen als ganzes aufgenommen. Ein solcher Vorgang ist von der Larvalentwicklung einiger Schwämme bekannt. Dabei werden „Ammen-Zellen“ (nurse cells) von den Oocyten aufgenommen, die anschließend ihren Zellkern auflösen (Bergquist 1978). Dies könnte auch bei *A. verrucosa* der Fall sein. Die Matrix in den Vakuolen könnte das Mesohyl der ingestierten Zellen sein, zudem findet man membranumrandete Bereiche in den Vakuolen, die den degradierten Zellkernen zugeordnet werden könnten. Erstaunlich ist das Überdauern der Bakterienzellen in den Vakuolen, obwohl viele andere Zellbestandteile aufgelöst wurden. Die wiederholte Phagozytose der Zellen oder Vakuolen konnte

man an den multiplen sie umschließenden Membranen erkennen. Im Mesohyl der Oocyte waren zudem stabförmige Einschlüsse und Dottersubstanzen, wie sie auch aus *Tethya aurantium* und *Petrosia ficiformis* beschrieben wurden (Sciscioli et al. 1997, 2002). Oviparie, die Freisetzung von Eiern und nicht von im Schwamm entwickelten Larven, wurde von *Axinella damicornis* (Lévi 1950) beschrieben und die Einlagerung großer Mengen Dottersubstanz ist charakteristisch für diese Fortpflanzungsstrategie bei Schwämmen (Sciscioli et al. 2002).

Offen bleibt aber, ob es sich bei den Bakterien gefüllten Vakuolen um Nahrungsspeicher oder die vertikale Übertragung von symbiontischen Bakterien an die Tochtergeneration handelt, wie sie beim Schwamm *Chondrilla australiensis* und seinen symbiontischen Cyanobakterien gezeigt werden konnte (Usher et al. 2001). Die Bedingung für eine Weitergabe der Endobionten ist eine Resistenz der Bakterien gegen lysosomale Enzyme des Wirtes und eine Verhinderung der Fusion der Symbiosome mit den Lysosomen des Schwammes (Sarà et al. 1998). Eine solche Resistenz könnte der Grund dafür sein, dass die sonstigen Bestandteile in der aufgenommenen Zelle lysiert wurden, die Bakterien selber aber erhalten blieben.

5.2.4 Kultivierte bakterielle Diversität

Bei ökologischen und taxonomischen mikrobiellen Untersuchungen lassen sich aus vielen Lebensräumen nur 0,01-10% der Gesamtbakterien isolieren und kultivieren (Daley 1979). Um diesem Problem entgegenzutreten, bestimmt man bakterielle Gemeinschaften immer häufiger über kultivierungsunabhängige, molekularbiologische Methoden (Amann et al. 1995). Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass man keine physiologischen Eigenschaften der Bakterien in Kultur testen und über DNA-Sequenzen unbekannte Bakterien nur annähernd bestimmen kann. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit neben der Bestimmung der genetischen Diversität auch die aerob kultivierbaren Mikroorganismen aus *Axinella verrucosa* (vgl. 5.2.5) bestimmt.

Die Bakterien in Schwämmen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: einerseits die kosmopolitischen Bakterien, die sowohl im Gewebe als auch im Umgebungswasser zu finden sind und andererseits solche, die nur aus den Schwämmen isoliert werden

können und nicht im Umgebungswasser oder Sediment vorkommen (Vacelet und Donadey 1977, Santavy et al. 1990). Allerdings ist der Vergleich zwischen Schwamm- und Umgebungswasserbakterien recht schwierig, da die Bakterien im Schwammgewebe durch die Filterleistung der Schwämme stark angereichert werden. Einige planktische Bakterien werden aufgrund ihrer geringen Konzentration im Wasser nicht erfasst, sie lassen sich aber durch die Anreicherung in den Schwämmen nachweisen (Burja und Hill 2001). Generell besitzt das Umgebungswasser aber eine höhere mikrobielle Diversität als die Schwämme (Santavy et al. 1990). Die bakterielle Zusammensetzung der isolierbaren Mikroorganismen aus den Schwämmen unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen (Madri et al. 1971). Neben aeroben Bakterien, wie sie auch im Meerwasser vorkommen, lassen sich aus dem Schwammgewebe auch fakultativ anaerobe Organismen isolieren (Wilkinson 1978 b, Santavy et al. 1990).

Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in Schwämmen unterscheidet sich deutlich von der des umgebenden Seewassers (Giovannoni und Rappé 2000, Rappé et al. 2000, Hentschel et al. 2002). Offensichtlich übt der Schwamm einen starken selektiven Druck gegenüber den planktischen Meerwasserbakterien aus.

Einige der *A. verrucosa*-Bakterienisolate wurden zuvor schon aus anderen Schwämmen isoliert. *Bacillus subtilis* wurde aus *Verongia sp.* isoliert, der dort die gleichen antifungalen Metabolite synthetisierte, die symbiontische Bakterien in Embryonen von Crustaceen gegen den Befall von parasitischen Pilzen freisetzen (Gil-Turnes et al. 1989, Gil-Turnes und Fenical 1992). Insgesamt waren 25% der kultivierten Bakterienstämme aus *Verongia sp.* Bacillen (Ivanova et al. 2000). *Bacillus subtilis* besitzt eine Kollagenaseaktivität, die einen Vorteil bei der Besiedlung des mit Kollagenfasern gefüllten Mesohyls darstellt. Außerdem ist die Art schon mehrfach als pathogener Organismus beschrieben worden (Fricke et al. 2001, Tran und Nagano 2002). Andere *Bacillus*-Isolate stammen aus verschiedenen mediterranen und pazifischen Schwämmen (Burja und Hill 2001, Hentschel et al. 2001, Webster et al. 2001a). Die Bacillen ließen sich in den *Axinella*-Proben nicht mit FISH nachweisen und besitzen somit wahrscheinlich keine besondere Assoziation mit den untersuchten Schwämmen.

Das isolierte α - Proteobakterium entspricht einem aus *Aplysina aerophoba* isolierten Bakterium und bildet ein deutliches Cluster im Stammbaum mit weiteren Bakterien

aus den Schwämmen *Forcepia* sp., *A. aerophoba* und *Rhopaloeides odorabile* (Hentschel et al. 2001, Webster und Hill 2001, Olson et al. 2002). Bestimmte α -Proteobakterien wurden regelmäßig in verschiedenen Schwammarten gefunden. Sie bildeten phylogenetische Gruppen und besitzen möglicherweise eine symbiontische Beziehung zu den Wirten (Olson et al. 2002). Bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wurden einzellige Bakterien mit der α -Proteobakterien spezifischen Gensonde im Gewebe markiert. Da in der Klondatenbank nur das filamentbildende α -Proteobakterium vertreten war, könnte es sich dabei um das isolierte Bakterium handeln.

Die beiden isolierten γ -Proteobakterien entsprechen *Pseudomonas stutzeri* und dem marinen Bakterium *Halomonas marina* (Sorokin et al. 1999, Arahal et al. 2002). Pseudomonaden stellten die dominante Gruppe, die aus dem Schwamm *Micricionia prolifera* isoliert wurde, allerdings waren sie auch die anteilig größte Gruppe im Umgebungswasser (Madri et al. 1971). Mehrere aus Schwämmen isolierte *Pseudomonas*-Arten produzieren vorher unbekannte Metabolite (Jayatilake et al. 1996, Bultel-Poncé et al. 1999, De Rosa et al. 2000).

Micrococcus luteus wurde zuvor aus *Xestospongia* sp. (Bultel-Poncé et al. 1997, 1998) und *Micricionia prolifera* isoliert (Madri et al. 1971). Sponga et al. (1999) verglichen die kultivierbaren Actinobakterien verschiedener Mittelmeerschwämme miteinander und erhielten mit Abstand die meisten Stämme aus *Axinella damicornis*. Über die Hälfte aller isolierten Actinobakterien aus verschiedenen Schwammarten des Mittelmeeres, der Nord- und Ostsee gehörten zur Gattung *Micrococcus*. Allerdings zeigten auch die vergleichenden Diversitätsuntersuchungen, dass sich die Bakterien aus den Schwämmen auch alle in den Wasserproben wiederfinden ließen (Grabowski 2002). Die größte Sequenzübereinstimmung hatte das kultivierte Bakterium aus *A. verrucosa* mit einem mit dem Dinoflagellaten *Alexandrium affine* assoziierten *M. luteus* (Hold et al. 2001). Mit FISH wurden keine Actinomyceten direkt im Schwammgewebe von *A. verrucosa* nachgewiesen, sie könnten somit wohl eher mit dem Seewasser eingestrudelte Organismen sein.

5.2.5 Klonierte bakterielle Diversität

Die Einführung des ribosomalen 16S RNA-Ansatzes hat die mikrobielle Ökologie revolutioniert. Mit Hilfe des 16S rRNA-Gens als phylogenetischen Marker ist es möglich, Bakterienpopulationen unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit in Umweltproben bestimmen zu können (Amann et al. 1997, Amann und Kühl 1998, Martin 2002, Gabor et al. 2003). Selbst wenn man die Einschränkungen von PCR bezogenen Methoden mit möglichen Fehlern bei der DNA-Extraktion und Amplifikation berücksichtigt (von Wintzingerode et al. 1997), handelt es sich um eine leistungsstarke Methode, komplexe mikrobielle Lebensgemeinschaften darzustellen. Die Anwendung der Technik bei Umweltproben offenbarte vorher nicht bekannte mikrobielle Diversitäten (Hugenholtz et al. 1998) und erfasst schätzungsweise >99% der gesamten mikrobiellen Gemeinschaften (Amann et al. 1995).

Die Untersuchungen der bakteriellen *A. verrucosa*-Endobionten ergaben mehrere phylogenetische Gruppen. Wie das α -Proteobakterium, so zeigten auch die anderen Schwammendobionten großen Sequenzunterschiede zu bisher bekannten Bakterien (vgl. 4.3.2). Die tiefe Abspaltung der Endobionten im phylogenetischen Stammbaum könnte ein Indiz für eine frühe evolutionär symbiontische Verbindung der Organismen sein. Hinweise auf solche Koevolutionen wurden zuvor schon gefunden (Erpenbeck et al. 2002, Thacker und Starnes 2003). Koevolutionen zwischen dem Wirt und dem Symbionten treten meist in sehr alten Symbiosen auf, bei denen der Wirt einen einzelnen oder wenige Symbionten beherbergt (Baumann et al. 2000). *A. verrucosa* zeigte im Gegensatz dazu fünf scheinbar ganz eigene Bakterienpopulationen, die in Proben der Art von verschiedenen mediterranen und atlantischen Standorten vorkamen.

Die assoziierten α -Proteobakterien von *A. verrucosa* wurden bereits diskutiert (vgl. 5.2.2). Die nachgewiesenen γ -Proteobakterien besitzen mit einer Sequenzübereinstimmung von <89% nur geringe Ähnlichkeiten mit bereits beschriebenen Bakterien. Die Sequenzen besitzen nur im Fall des Clusters Gamma-I als nächstverwandten Klon ein planktisches marines Bakterium. Die beiden anderen Gamma-Cluster ähneln dagegen Sequenzen aus antarktischen Sedimenten. Auffällig ist die Nähe der Gamma-II Sequenzen zu denen verschiedener Kiemensymbionten in Muscheln

(Kraus 1996, Krueger und Cavanaugh 1997). Diese chemoautotrophen Organismen bilden ein separates Cluster innerhalb der γ -Proteobakterien (Eisen et al. 1992).

Die Sequenz Nitrospira-I zeigt die größte verwandtschaftliche Nähe zu einem unkultivierten Bakterium aus *Aplysina aerophoba*. Ähnliche Sequenzen wurden auch aus *Theonella swinhoei* bestimmt, so dass sie sich phylogenetisch in ein Schwamm Bakterien Cluster ordnen lassen. Hentschel et al. (2002) sprechen dieser Gruppe nur eine kurzzeitige Abspaltung von frei lebenden Verwandten zu. Die Sequenzübereinstimmung von 93% zwischen dem *A. aerophoba* Klon und dem Nitrospira-I Klon aus *A. verrucosa* deutet eine größere Distanz an, als sie tatsächlich vorliegen dürfte. Obwohl auch kurzen Sequenzen eine ähnlich genaue phylogenetische Vergleichbarkeit nachgesagt wird (Schmidt et al. 1991), spiegeln die verglichenen kurzen Sequenzen aus einer variablen 16S rRNA Region nicht die tatsächliche Sequenzübereinstimmung wie bei einem Vollängenvergleich wider.

Das nächstverwandte Bakterium von Klon Delta-I, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, ist ein fakultativ anaerober Mikroorganismus (Sanford et al. 2002). Trotz der hohen Pumpleistung von Schwämmen (Reiswig 1971) gibt es in ihrem Gewebe sauerstoffarme Bereiche. Gatti et al. (2002) zeigten im Vergleich zum Umgebungswasser etwa halb so große Sauerstoffgehalte im Gewebe von *Suberites domuncula*. Im Gewebe verschiedener Schwammarten wurden bereits sulfatreduzierende δ -Proteobakterien gefunden (Imhoff und Trüper 1976, Manz et al. 2000). Schumann-Kindel et al. (1997) zeigten, dass sie sich besonders stark beim Absterben der Schwämme entwickeln. Galten sulfatreduzierende Bakterien (SRB) bis vor kurzem als obligat anaerob (Maidigan et al. 2000), so wurden in den letzten Jahren auch SRB gefunden, die unter oxigenen Bedingungen wachsen können (Minz et al. 1999a, 1999b, Sigalevich et al. 2000a, 2000b, Sigalevich und Cohen 2000). Eine Besiedlung der Schwämme durch SRB aus dem Meerwasser ist aufgrund der dortigen Sauerstoffbedingungen eher unwahrscheinlich. Allerdings sind sie in 0,5 bis 1,5cm Tiefe im marinen Sediment zu finden (Sahm et al. 1999, Ravenschlag et al. 2000), von wo aus sie die Schwämme besiedeln könnten.

Friedrich et al. (1999) fanden δ -Proteobakterien als dominante Gruppe im Gewebe von *Aplysina cavernicola* und auch Hentschel et al. (2002) beschrieben zwei deutliche Cluster von ähnlichen δ -Proteobakterien für verschiedene Schwammarten. Die

Sequenz aus *Axinella verrucosa* ordnet sich nicht in eine dieser Gruppen ein und besitzt auch eine deutliche phylogenetische Distanz zum Schwammsymbionten *Candidatus Entotheonella palauensis* (Schmidt et al. 2000).

Die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung für die δ -Proteobakterien ergab sowohl Signale von vereinzelt Bakterien im Schwammgewebe, als auch von nah beieinander liegenden Bakterien innerhalb der Schwammzellen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Bakterien in den Vakuolen der Archäocyten. Eine Übereinstimmung der FISH-Markierungen mit den Bakterienfunden bei den ultrastrukturellen Untersuchungen konnte nicht zweifelsfrei belegt werden, sie ist aber sehr wahrscheinlich.

Der Domäne der Archaea hat man lange Zeit hauptsächlich Mikroorganismen aus Extremhabitaten zugesprochen. Die üblichen phänotypischen Archaea-Gruppen wurden ursprünglich als entweder methanogen, extrem halophil, extrem thermophil oder als Sulfatreduzierer betrachtet (DeLong 1992). Preston et al. (1996) beschrieben *Cenarchaeum symbiosum*, eine symbiontische Crenarchaea aus dem Schwamm *Axinella mexicana*. Der einzellige Mikroorganismus kam regelmäßig im Gewebe der Schwämme vor und seine Abundanzen blieben auch bei längerer Hälterung des Wirtes konstant. Später wurden zwei ähnliche - aber deutlich trennbare Populationen - von *C. symbiosum* in den Schwämmen beschrieben (Schleper et al. 1998). Webster et al. (2001b) fanden Sequenzen sowohl von Crenarchaeoten und Euryarchaeoten im Schwamm *Rhopaloeides odorabile* und konnten die Mikroorganismen besonders im Bereich des Pinacoderms nachweisen.

Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen isolierten Archae-Sequenzen besitzen eine große Übereinstimmung (99,37%) mit einer Sequenz aus *Axinella damicornis* des westlichen Mittelmeeres. Margot et al. (2002) beschrieben drei ähnliche Archaea Populationen aus *Axinella* sp., *A. damicornis* und *A. verrucosa*. Mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung bestimmten sie ein filamentbildendes Bakterium aus dem *Axinella*-Spongium als Archaeobakterium. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen aus den *Axinella*-Proben um Elba und des Atlantiks (vgl. 4.2.1). Hier konnten die myzelbildenden Mikroorganismen mit FISH im Schwamm sowohl mit Eubakterien- und α -Proteobakterien- als auch mit artspezifischen Gensonden markiert werden. Archaeobakterien konnten im Gewebe nur sehr vereinzelt dargestellt werden, obwohl

die zugehörige Bande im SSCP-Gel stark ausgeprägt war. Dies könnte ein Artefakt der PCR Amplifikation sein, bei der sowohl durch die Primer, die Reaktionsbedingungen als auch durch den Zustand der untersuchten Zellen vor der DNA-Extraktion selektiv Sequenzen bestimmter Mikroorganismen bevorzugt vervielfältigt werden können (Silva und Batt 1995). Muyzer et al. (1993) fanden, dass die Bandenintensitäten in den Gelen nicht unbedingt mit den Konzentrationen an DNA in der Ausgangsprobe korreliert.

Die erzielbaren Ergebnisse der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung sind nicht immer gleich. Sie sind abhängig vom untersuchten Ökosystemtyp und den benutzten Fluorochromen (Bouvier und del Giorgio 2003). Neben der Verwendung eines stabilen Fluorochroms (Cy3), wurde bei der vorliegenden Untersuchung zusätzlich immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle für die entsprechende Sonde mitgefärbt.

Archae sind zuvor in Verbindung mit dem filamentbildenden γ -Proteobakterium *Thiothrix* sp. gefunden worden. Dabei waren sie in faserigen globulären Strukturen perl schnurartig auf den fadenförmigen Bakterien angeordnet (Rudolph et al. 2001, Moissel et al. 2002).

Vergleicht man die isolierte Diversität mit der klonierten bakteriellen Diversität aus *Axinella verrucosa*, so findet man keinerlei Übereinstimmung. Die klonierten Bakteriengruppen lassen sich aber sowohl in den SSCP- und DGGE-Gelen, als auch bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung nachweisen. Die deutliche Dominanz der γ -Proteobakterien in der Klonbank und in den SSCP-Gelen zeigt sich auch bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung im Schwammgewebe. Sie stellen den überwiegenden Teil der Mesohylbakterien. Zusätzlich zu den FISH-Untersuchungen zeigt der SSCP-Bandenvergleich der verschiedenen DNA-Extraktionsansätze, dass die α -Proteobakterien das Spongium von *A. verrucosa* besiedeln. Sie wurden besonders bei der DNA-Amplifikation aus den isolierten Spongiumfasern nachgewiesen. Dann war ausreichend Template DNA der α -Proteobakterien im Vergleich zu den anderen Bakterien vorhanden, da sie sich nur schwer aus dem Spongium lösen ließ.

Vertreter der δ -Proteobakterien wurden sowohl beim Klonierungsansatz als auch im Gewebe selber nachgewiesen.

Das präsentierte Beispiel von *A. verrucosa* zeigt deutlich, dass mit dem molekularbiologischen Ansatz die tatsächlich mit dem Wirt vergesellschafteten Mikroorganismen nachweisbar sind. Das konstante Auftreten der Bakterien der drei γ -, des α - und

des δ -Proteobakteriums, sowie des Archaeobakteriums in allen untersuchten *A. verrucosa* Proben, sowohl aus dem Mittelmeer, als auch aus dem Atlantik, macht eine spezifische Assoziation zwischen dem Wirt und den Endobionten sehr wahrscheinlich. Bisher gibt es keinen Nachweis für einen stofflichen Austausch zwischen den beteiligten Organismen, der eine Symbiose belegen würde. Die früh abspaltenden Äste in den phylogenetischen Stammbäumen der Bakterien, könnten aber ein Indiz für eine lange isolierte evolutionäre Entwicklung in den Schwämmen sein.

5.3 Pilze aus den Schwammproben

5.3.1 Isolierte Hyphenpilze aus den untersuchten Schwämmen

Der gewählte Isolierungsansatz für Pilze aus Schwämmen war darauf ausgelegt, selektiv solche Pilze zu kultivieren, die in der Lage sind auf Seewassermedien zu wachsen. Damit sollte der Anteil der kultivierten Keime terrestrischen Ursprungs von vorneherein reduziert und die an marine Umweltbedingungen angepassten Pilze gefördert werden. Die Ergebnisse zeigen aber, dass bei den angewandten Bedingungen fast ausschließlich Pilze aus Gattungen, die als Luft- oder Bodenkeime bekannt sind isoliert wurden. Schaumann (1974) isolierte ebenfalls viele Pilze terrestrischer Gruppen aus Wasser- und Sedimentproben der Nordsee und des Atlantiks. Dabei ließ sich der größere Teil der Nordseeproben nur auf Leitungswassermedien kultivieren, wohingegen mehr Pilze der Atlantikproben auf Seewassermedien zu züchten waren. Er zeigt eine Korrelation zwischen der Entfernung der Probenstandorte vom Festland und des bevorzugten Wachstums der Pilze auf Salzwasser- oder Leitungswassermedien. Mehrere Autoren haben Pilze von verschiedenen marinen Habitaten und aus unterschiedlichen marinen Organismen isoliert, wobei neben einigen obligat marinen Pilzen, der Großteil der erhaltenen Arten zu den Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Trichoderma* und *Phoma* gehörte (Genilloud et al. 1994, Hyde et al. 1998, Christophersen et al. 1999). Sallenave-Namont et al. (2001) postulieren, dass die hohe Diversität an *Penicillium*-, *Aspergillus*- und *Trichoderma*-Arten die sie in marinen Sedimenten gefunden haben darauf hinweist, dass diese Arten an den marinen Lebensraum ange-

passt sind und sich dort reproduzieren. Cuomo et al. (1988) ordnen diese Gattungen jedoch allesamt terrestrischen Kontaminationen zu und trennen sie strikt von marinen Pilzen.

Der Vergleich mit vorangegangenen Arbeiten über Pilzisolierungen aus Schwämmen zeigt Übereinstimmungen mit den hier erhaltenen Gattungen und Arten (Siepmann und Höhnk 1962, Abrell et al. 1996a, 1996b, Varoglu et al. 1997, Mohapatra et al. 1998, Höller et al. 1999, 2000, Masuma et al. 2001, Ui et al. 2001, Malmstrøm et al. 2002). Sponga et al. (1999) haben die isolierten Pilze aus einigen Schwammarten quantifiziert und erhielten besonders viele Isolate aus *Chondrosia reniformis* und *Spongia officinalis*. Bei den eigenen Untersuchungen der mediterranen Schwämme vor Elba wiesen diese Arten aber eher unterdurchschnittlich viele isolierbare Pilze auf. Hefen wurden zuvor ebenfalls schon aus verschiedenen Schwammarten isoliert, die aber mit den Organismen der Umgebung übereinstimmten und keine Assoziationen mit den potentiellen Wirten zeigten (Roth et al. 1962, Siepmann und Höhnk 1962). *Debaryomyces subglobosum*, unter anderem auch aus mehreren Schwammarten isoliert, wird aber als Vitaminspender eine mögliche ökologische Funktion zugesprochen (Siepmann und Höhnk 1962).

Die reinen Isolationen von Pilzen lassen also keinen Schluss über den Status der erhaltenen Pilze zu. Das entspricht vorangegangenen Untersuchungen (Höller et al. 2000). Die Isolation von terrestrischen Arten und der fehlende Nachweis im Gewebe sprechen aber gegen einen schwammassoziierten Status. Es wurden keine obligat marinen Pilze isoliert, sondern höchstens potentielle fakultative marine Pilze. Viele der isolierten Schimmelpilze, können auch bei geringeren Wasseraktivitäten wachsen (Madigan et al. 2000). Die in Standardmedien benutzten Glukosekonzentrationen mindern deutlich den inhibierenden Effekt von Seewasser in Kultivierungsansätzen (Kirk 1980). Deshalb konnten sie bei den „marinen Kultivierungsansätzen“ auch auskeimen und die benutzten Medien erbrachten nicht die gewünschte Selektion. Ein zusätzlicher Grund für die bevorzugte Kultivierung von terrestrischen oder fakultativ marinen Pilze ist, dass diese oft schneller unter den Laborbedingungen wachsen und mögliche obligat marine Pilze im Kultivierungsansatz verdrängen (Kohlmeyer und Kohlmeyer 1979). Die getesteten Sterilisierungsansätze der Schwammstücke sind nicht vorteilhaft, da sie keinerlei Effekt auf die isolierten Pilzarten hatten. Da die Myzelien von potentiellen Schwammsymbionten auch empfindlicher sind als ruhende

Sporen, könnten die Sterilisierungen sogar das Anzüchten der Kontaminationen fördern.

Die histologischen Untersuchungen der Schwämme haben keinerlei Anzeichen für endobiontische Pilze im Gewebe geliefert und die Beobachtungen pilzlicher Strukturen durch Höhnk und Ulken (1979) können für die hier untersuchten Schwämme nicht bestätigt werden. Sie haben aber auch selber auf die schwierige Unterscheidung zwischen Myzelien und schwammeigenen filamentartigen Strukturen bei ihren ungefärbten Proben hingewiesen. Als Urheber der kultivierten Pilze aus den Schwämmen konnten Sporen im Gewebe dargestellt werden, die den isolierten Pilzarten zugeordnet werden konnten. Auch wenn die Färbungen der histologischen Präparate eine Bestimmung der Konidien im Gewebe erschwerte, so konnten keine Konidien typisch mariner Pilze nachgewiesen werden. Lediglich der filamentbildende Mikroorganismus auf der Schwammoberfläche von *Leuconia aspera* könnte potentiell auch ein Pilz sein. Über die reine rasterelektronenmikroskopische Darstellung lässt er sich aber nicht bestimmen.

Einige der aus den verschiedenen Schwammproben isolierten Pilzarten, wie *Penicillium chrysogenum* und *Emericella varicolor* bildeten bisher nicht bekannte Metabolite. Die beiden ubiquitär verbreiteten Arten sind zuvor schon intensiv auf ihr Naturstoffpotential hin untersucht und bereits aus Schwämmen isoliert worden (Samson et al. 2000, Ui et al. 2001, Malmstrøm et al. 2002). *Aspergillus niger*, ein weitverbreiteter Pilz aus dem Boden und als Kontamination von Lebensmitteln bekannt, zeigte auch eine neue Metabolitenzusammensetzung nach der Isolation aus verschiedenen Schwammarten (Doshida et al. 1996, Varoglu et al. 1997, Amagata et al. 1998, Gams et al. 1998, Toske et al. 1998). *A. niger* wurde auch bei den hier präsentierten Untersuchungen aus Schwammproben vor Elba isoliert.

Da man Pilze aus marinen Habitaten oft aus anderen Organismen isoliert hat und einige der Pilze auch beispielsweise mit Algen in symbiontischen Beziehungen leben, wird ihnen ein besonders großes Potential für die Synthese von bisher unbekanntem Naturstoffen zugesprochen (Biabani und Laatsch 1998). Masuma et al. (2001) haben bei vergleichenden Untersuchungen zeigen können, dass Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Trichoderma*, die als typische terrestrische Arten gelten, je nach Isolationsort unterschiedliche physiologische Ansprüche haben. So wuchsen die aus marinen Habitaten isolierten Pilze deutlich besser auf Seewassermedien und

zeigten auf salzarmen Medien nur ein eingeschränktes Wachstum. Bei den terrestrischen Isolaten war dies genau umgekehrt und das gleiche Phänomen zeigte sich bei der Produktion von antimikrobiellen Substanzen durch die Pilze.

Diese Ergebnisse decken sich mit den vorliegenden Untersuchungen an *Penicillium chrysogenum*, bei dem man eine deutliche Korrelation zwischen Wachstum, Reproduktion, Metabolitenproduktion und der Salinität des Kultivierungsmediums bei der Produktion von Sorbicillacton A-D erkennt. So sind also nicht nur die veränderten Kultivierungsbedingungen für die Metabolitenproduktion verantwortlich, sondern scheinbar auch spezifische Anpassungen an den Lebensraum aus denen die Pilze isoliert wurden (Jones und Jensen 1999). Worasatit et al. (1994) fanden Unterschiede in der Enzymproduktion bei asexuell produzierten Nachkommen von Pilzen durch Einzelsporenisolationen, was auch der Grund für die unterschiedlichen Metabolitenspektren verschiedener Stämme einer Art sein kann.

Es stellt sich nun die Frage, ob die physiologischen Eigenschaften von *P. chrysogenum* eine Aussage über den Status als fakultativ marinen Pilz erlauben. Nach der Definition von Kohlmeyer und Kohlmeyer (1979) zeigt der Pilz mit einem Wachstum und einer Reproduktion bei „marinen“ Bedingungen die Voraussetzungen dafür. Allerdings haben die untersuchten Pilze die Fähigkeiten bisher nur unter Kulturbedingungen gezeigt und konnten nicht im marinen Habitat dargestellt werden.

Eine Unterdrückung von pilzlicher Besiedlung der Schwämme zeigen beschriebene antifungale Metabolite sowohl aus den Schwämmen selber, als auch aus schwammassoziierten Bakterien (Madri et al. 1971, Uriz et al. 1991, Muricy et al. 1993, Pettit et al. 1998, Ovechkina et al. 1999, Sata et al. 1999, Ivanova et al. 2000, Schmidt et al. 2000). Den Nachweis solcher Systeme zeigen symbiotische Bakterien in Embryonen verschiedener Krebsarten, die diese vor dem Befall des crustaceenpathogenen Pilzes *Lagenidium callinectes* schützen (Gil-Turnes et al. 1989, Gil-Turnes und Fencal 1992). Das aber auch als terrestrisch geltende Pilzgattungen im Meer aktiv sein können zeigt *Aspergillus sp.* als Verursacher der „Schwarzen-Band-Krankheit“ (black-band disease) bei Korallen (Priess et al. 2000).

5.3.2 Isolierte pilzähnliche Protisten aus den untersuchten Schwämmen

Die Ergebnisse der Isolationsversuche der Labyrinthulamyceeten zeigten, dass die Protisten weder eine besondere Assoziation mit den untersuchten Schwämmen besitzen, noch durch die Filtrierer in ihrem Gewebe stark angereichert wurden. Das sich der überwiegende Teil der im Schwamm befindlichen pilzähnlichen Protisten durch das Halten der Schwämme in sterilfiltriertem Seewasser oder durch das Auspressen der Tiere aus ihnen lösen ließ zeigt, dass die Protisten kein ektoplasmatisches Netz zur Verankerung der Zellen am Substrat ausgebildet haben. Dies ist aber die Voraussetzung für das Durchwachsen des Wirtes und die Einleitung von Vermehrungszyklen (Raghukumar 2002).

Über Thraustochytrien aus Schwämmen gibt es erst wenige Berichte. Höhnk und Ulken (1979) haben Thraustochytrien aus verschiedenen Schwammarten vor der Küste Ischias untersucht und konnten die Protisten in unterschiedlichen Dichten pro Schwamm-Individuum nachweisen. Die meisten der Phycomyceten haben sie dabei aus *Geodia cydonium* isoliert. Bei der Untersuchung von fixierten Schwammschnitten haben sie vereinzelt Sporangien gefunden, was ein Hinweis auf die Reproduktion der „niederen Pilze“ in oder auf den Schwämmen ist. Untersuchungen an vier Schwammarten der Nordsee zeigten, dass die aus dem Gewebe isolierten Thraustochytrien denen des Umgebungswassers glichen und auch keine deutliche Anreicherung von ihnen im Wirt auftrat (Richter 1985). *Schizochytrium aggregatum* wurde im Standortwasser der Nordseeproben gefunden, konnte aber aus keiner der Schwammproben isoliert werden. Dies entspricht auch in etwa den jetzigen Untersuchungen der mediterranen Schwämme. So wurden die Schizochytrien überwiegend aus dem Umgebungswasser und dem Spülwasser, bei dem sich die Protisten selber vom Schwamm gelöst hatten, isoliert. Nur in einem Fall, bei *Petrosia ficiformis* kam es zu einer Isolation aus dem homogenisierten Schwammgewebe. Absterbende und bereits deutlich von Bakterien befallene Schwämme erscheinen als gutes Substrat für die „niederen Pilze“, da sie in wesentlich höheren Anzahlen von Richter (1985) aus ihnen isoliert werden konnten. Dies deutet auf Abwehrsubstanzen der untersuchten Schwämme hin, die dann bei den absterbenden Tieren nicht mehr zum Tragen kommen (Richter 1985).

Im Vergleich zu pflanzlichen Substraten werden nur wenige Tiere von Labyrinthulomyceten befallen, wie einige marine Schnecken und Fische, bei denen sie aber meist als sekundäre Parasiten nach zuvor erfolgter Schädigung auftreten (Raghukumar 2002). Eine mögliche symbiontische Assoziation wurde bisher mit Hydrozoen beschrieben (Raghukumar 1988). Obwohl in Zellkulturansätzen Affinitäten von Thraustochytrien für Zellen von Korallen, Schwämmen, Tunikaten und Muscheln gezeigt wurden (Raghukumar 2002), können bei den jetzigen Untersuchungen keine spezifische Verbindung zwischen den Organismen festgestellt werden. Das zeigten neben den Kultivierungsansätzen auch die histologischen Untersuchungen, bei denen keine Anzeichen für eine Besiedlung der untersuchten Schwämme mit den pilzähnlichen Protisten zu finden waren.

5.4 Schlußbetrachtung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein konstant vorkommender filamentbildender Mikroorganismus in den Skelettelementen des Schwammes *Axinella verrucosa* nachgewiesen werden. Dieses Bakterium wurde mikromorphologisch charakterisiert, über molekularbiologische Ansätze phylogenetisch eingruppiert, mit entwickelten Gensonden direkt im Gewebe nachgewiesen und seine kollagenolytischen Eigenschaften dargestellt. Es gibt deutliche Anzeichen für eine echt symbiontische Beziehung mit seinem Wirt.

Die Ergebnisse werfen weitergehende Fragen auf. Wie kommt es zur Ausbildung der Interzytoplasmatischen Membran und ist sie ein Hinweis auf besondere physiologische Eigenschaften der Bakterien? Führt die Interzytoplasmatische Membran zu einer echten Teilung der Zellen in einen nucleären und zytoplasmatischen Bereich? Lässt sich über die genetische Distanz der Bakterien zu anderen Vertretern der Gruppe eine evolutionäre Isolation im Wirt zeigen? Intensive Isolationsansätze könnten zu einer Kultivierung der Sponginbakterien führen und neben der genauen taxonomischen Einordnung zur Charakterisierung der bakteriellen Kollagenase führen.

Bei den intrazellulären Bakterienvakuolen der Archäocyten von *A. verrucosa* konnte gezeigt werden, dass sie eine offensichtliche Funktion in der Embryonalentwicklung besitzen. Weiterführende Untersuchungen der intrazellulären Bakterien, besonders in

den Larvenstadien der Schwämme, könnten zur Aufdeckung ihrer Funktion als Nahrungsreserve oder horizontal an die Tochterorganismen weitergegebene Endobionten führen.

Clathrina clathrus besitzt eine einzigartige Bakterienpopulation im Vergleich zu den anderen untersuchten Schwammspezies. Weitergehende systematische Untersuchungen zur spezifischen Assoziation der Mikroorganismen bieten sich daher bei diesem Schwamm an.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde erstmalig umfassend der Status von aus Schwämmen isolierbaren Pilzen dargestellt. Obwohl weder Anzeichen für eine Verbindung von Pilzen mit Schwämmen gefunden wurde, noch vegetative Zellen in den Schwämmen nachweisbar waren, zeigten die Isolate teils deutliche physiologische Unterschiede zu terrestrischen Vertretern derselben Arten. Gibt es Anpassungsmechanismen der terrestrischen Pilzarten an das marine Milieu oder handelt es sich hierbei nur um Kultivierungsartefakte? In Zukunft müssen neue Kultivierungsansätze für die Pilze getestet werden, die den Bedingungen im marinen Lebensraum deutlich näher kommen. Diese sollten dann zu einer Aussage bezüglich ihrer Herkunft führen.

Der Vergleich der Kultivierungsansätze mit den verschiedenen molekularbiologischen Methoden zeigte deutliche Unterschiede bei den erzielbaren Ergebnissen. Obwohl sich die über ihre ribosomale RNA bestimmte Bakteriendiversität in den Schwämmen sehr gut mit den FISH-Ansätzen belegen ließ, müssen dennoch die Grenzen und möglichen Ungenauigkeiten der molekularbiologischen Methoden und des noch begrenzten Datensatzes an Vergleichssequenzen beachtet werden.

6 Zusammenfassung

Die Erforschung von mikrobiellen Endobionten mariner Schwämme stand in den letzten Jahren überwiegend im Interesse naturstoffphysiologischer Untersuchungen. Dabei lag der Schwerpunkt der Erhebungen auf den aus den Schwämmen isolierbaren Bakterien und Pilzen und ihrem Potential, neue Sekundärmetabolite bilden zu können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den möglichen Assoziationen zwischen den Mikroorganismen und den Schwämmen.

Aus siebzehn verschiedenen Schwammarten wurden die kultivierbaren Pilze bestimmt und diese mit denen des Umgebungswassers und des Sedimentes verglichen. Es wurden fast ausschließlich Vertreter von terrestrischen Pilzgattungen *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma* und *Verticillium* isoliert und kultiviert. Diese deckten sich mit den Pilzisolaten aus der untersuchten Schwammumgebung. Die histologischen Untersuchungen zeigten keine vegetativen Pilzstrukturen oder Hyphen im Schwammgewebe. Es wurden lediglich einzelne Pilzsporen im Gewebe gefunden, die wahrscheinlich durch das wasserleitende Kanalsystem der Schwämme dorthin transportiert wurden. Die Sporen können aufgrund ihrer taxonomischen Übereinstimmung als Ursprung der isolierten Pilze angesehen werden. Einige Pilzisolate aus terrestrischen Gattungen wuchsen gut auf Medien mit Meerwassersalinität und bildeten bisher unbekannte Metabolitenspektren. In Verbindung mit den histologischen Ergebnissen ist das aber entweder auf die Kultivierungsbedingungen oder die Inkubation der Sporen im marinen Milieu zurückzuführen und nicht auf eventuelle Assoziationen mit dem Schwamm.

Die mikromorphologisch untersuchten Schwammarten ließen sich, übereinstimmend mit früheren Untersuchungen, in zwei Gruppen teilen. Einerseits in Arten mit vielen Bakterien und verschiedenen Morphotypen im Gewebe, andererseits in Schwämme mit nur einem oder wenigen Bakterientypen. Besonders auffällig war der Kalkschwamm *Clathrina clathrus* mit nur einem spirillenförmigen Bakterium im Mesohyl. *Ircinia fasciculata*, *Chondrosia reniformis*, *Agelas oroides* und *Spirastrella cunctatrix* zeigten demgegenüber verschiedene, z. T. auch übereinstimmende Bakterien in ihren Interzellularräumen.

Axinella verrucosa zeigte regelmäßig vorkommende filamentbildende Bakterien im Spongin. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden diese mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) als α -Proteobakterien bestimmt. Mit generierten spezifischen Sonden konnten sie einer aus dem Schwamm klonierten 16S rRNA-Sequenz zugeordnet werden, die mit 86,7% die größte Ähnlichkeit zu *Aminobacter amnivorans* besaß. Die Mikroorganismen durchwachsen das Spongin indem sie seine kollagene Matrix auflösen ohne es zu zerstören. Die freigesetzte Kollagenase wurde enzymhistochemisch an der Bakterienoberfläche nachgewiesen. Die Bakterien besitzen eine Membran im Zytoplasma, die der Intrazytoplasmatische Membran der Planctomyceten Gattung *Pirellula* ähnelt.

Neben dem α -Proteobakterium besaßen die untersuchten *A. verrucosa* Spezies aus dem Mittelmeer und auch dem Atlantik konstant weitere Mikroorganismen, die bei keiner der anderen Schwammgattungen auftraten. Drei verschiedene γ -Proteobakterien, ein δ -Proteobakterium und ein Archaeobakterium konnten sowohl bei Klonierungsexperimenten als auch bei Diversitätsanalysen (SSCP, DGGE) von *A. verrucosa*-Proben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse decken sich zudem mit den FISH-Untersuchungen an Schwammschnitten. Die Bakterien besitzen nur eine geringe Ähnlichkeit mit den Sequenzen bekannter Bakterienarten (84,0-86,6%), wohingegen ähnliche Archae-Sequenzen zuvor aus verschiedenen *Axinella*-Arten isoliert wurden (Margot et al. 2002).

Die kultivierte bakterielle Diversität unterschied sich deutlich von der klonierten bakteriellen Diversität aus *A. verrucosa*. Die isolierten Bakterien ließen sich nicht mit gruppenspezifischen Sonden im Gewebe darstellen.

Die Archäocyten von *A. verrucosa* besitzen mit einem einzigen Bakterientyp gefüllte Vakuolen, die an die Oocyte weitergegeben werden. Dabei werden die Archäocyten auch als ganzes phagocytiert, wobei die Zellbestandteile lysiert werden und nur noch die Bakterien in den Vakuolen übrig bleiben. Diese sind dann häufig von mehreren Membranen umgeben. Offen bleibt, ob es sich dabei um Nahrungsreserven für die Embryonalentwicklung oder horizontal an die Tochtergeneration weitergegebene Symbionten handelt.

7 Literaturverzeichnis

- Abrell, L. M., B. Borgeson und P. Crews (1996a): Chloro polyketids from the cultured fungus (*Aspergillus*) seperated from a marine sponge. *Tetrahedron Lett.* 37: 2331-2334.
- Abrell, L. M., B. Borgeson und P. Crews (1996b): A new polyketide, secocurvularin, from the salt water culture of a sponge derived fungus. *Tetrahedron Lett.* 37: 8983-8984.
- Acinas, S. G., J. Anton und F. Rodriguez-Valera (1999): Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65(2): 514-522.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson (1994): *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing, New York.
- Althoff, A., C. Schütt, R. Steffen, R. Batel und W. E. G. Müller (1998): Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putative toxic bacteria? *Mar. Biol.* 130: 529-536.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, U. W. Meyers und D. J. Lipman (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410.
- Amade, P., D. Pesando und L. Chevlot (1982): Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Brittany. *Mar. Biol.* 70: 223-228.
- Amagata, T., Y. Usami, K. Minoura, T. Ito und A. Numata (1998): Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: physico-chemical properties and structures. *J. Antibiot.* 51: 33-40.
- Amann, R. und M. Kühn (1998): In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1(3): 352-358.
- Amann, R., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux und D. A. Stahl (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6): 1919-1925.
- Amann, R., W. Ludwig und K. H. Schleifer (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1): 143-169.
- Amann, R., F.-O. Glockner und A. Neef (1997): Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* 20(3-4): 191-200.

- Arahal, D. R., W. Ludwig, K. H. Schleifer und A. Ventosa (2002): Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(1): 241-249.
- Arillo, A., G. Bavestrello, B. Burlando und M. Sarà (1993): Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges: a possible mechanism. *Mar. Biol.* 117: 159-162.
- Ashen, J. B. und L. J. Goff (2000): Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7): 3024-3030.
- Assmann, M., E. Lichte, J. R. Pawlik und M. Köck (2000): Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedemayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207: 255-262.
- Bakus, G. J., B. Schulte, S. Jhu, M. Wright, G. Green und P. Gomez (1990): Antibiosis and antifouling in marine sponges: laboratory versus field studies. S. 102-108. In K. Rützler (Hrsg.), *New perspectives in sponge biology*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C..
- Barnett, H. L. und B. B. Hunter (1987): *Illustrated genera of imperfect fungi*. Macmillan Publishing Company, New York.
- Barthel, D. und B. Wolfrath (1989): Tissue sloughing in the sponge *Halichondria panicea*: a fouling organism prevents being fouled. *Oecol.* 78: 357-360.
- Baumann, P., N. A. Moran und L. Baumann (2000): Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. In: Dworkin, M. (Hrsg.): *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications* [online]. <http://link.springer.de/link/service/books/10125>. New York, Springer.
- Becerro, M. A., N. I. Lopez, X. Turon und M. J. Uriz (1994): Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 179: 195-205.
- Becerro, M. A., M. J. Uriz und X. Turon (1997): Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). *Hydrobiologia* 356: 77-89.
- Bell, A. H., P. R. Bergquist und C. N. Battershill (1999): Feeding biology of *Polymastia croceus*. *Mem. Queensl. Mus.* 44: 51-56.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, B. A. Rapp und D. L. Wheeler (2000): GenBank. *Nucl. Acids. Res.* 28(1): 15.
- Bergquist, P. R. (1978): *Sponges*. University of California Press, Berkeley.
- Bergquist, P. R. und J. J. Bedford (1978): The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae; systematic and geographic considerations. *Mar. Biol.* 46: 215-221.

- Bewley, C. A., N. D. Holland und D. J. Faulkner (1996): Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52: 716-722.
- Biabani, M. A. F. und H. Laatsch (1998): Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. *J. prakt. Chem.* 340: 589-607.
- Bigliardi, E., M. Sciscioli und E. Lepore (1993): Interactions between prokaryotic and eukaryotic cells in sponge endocytobiosis. *Endocytobiosis and Cell Res.* 9: 215-221.
- BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- Boute, N., J.-Y. Exposito, N. Boury-Esnault, J. Vacelet, N. Jean, M. Nobuhiro, K. Miyazaki, K. Yoshizato und R. Garrone (1996): Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biol. Cell.* 88(1-2): 37-44.
- Bouvier, T. und P. A. del Giorgio (2003): Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44(1): 3-15.
- Brauers, G., R. A. Edrada, R. Ebel, P. Proksch, V. Wray, A. Berg, U. Gräfe, C. Schächtele, F. Totzke, G. Finkenzeller, D. Marme, J. Kraus, M. Münchbach, M. Michel, G. Bringmann und K. Schaumann (2000): Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: novel inhibitors of protein kinases. *J. Nat. Prod.* 63: 739-745.
- Bringman, G., G. Lang, J. Mühlbacher, K. Schaumann, S. Steffens, P. G. Rytik und W. E. G. Müller (2003a). Sorbicillactone A, a structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-associated fungus. S. 231-253. In: W. E. G. Müller (Hrsg.): *Prog. Mol. Subcell. Biol.*. Springer, Berlin.
- Bringmann, G., G. Lang, S. Steffens, E. Günther und K. Schaumann (2003b): Evariquinone, isoemicellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus *Emericella varicolor*. *Phytochem.* 63: 437-443.
- Bultel-Poncé, V., J.-P. Berge, C. Debitus, J.-L. Nicolas und M. Guyot (1999): Metabolites from the sponge-associated bacterium *Pseudomonas* species. *Mar. Biotech.* 1: 384-390.
- Bultel-Poncé, V., C. Debitus, J.-P. Berge, C. Cerceau und M. Guyot (1998): Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *Mar. Biotech.* 6: 233-236.
- Bultel-Poncé, V., C. Debitus, A. Blond, C. Cerceau und M. Guyot (1997): Lutoside: an Acyl-1-(Acyl-6'-Mannobiosyl)-3-Glycerol isolated from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *Tetrahedron Lett.* 38(33): 5805-5808.
- Burja, A. M. und R. T. Hill (2001): Microbial symbionts of Australian Great Barrier Reef sponge, *Candidaspongia flabellata*. *Hydrobiologia* 461: 41-47.

- Burja, A. M., N. S. Webster, P. T. Murphy und R. T. Hill (1999): Microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.* 44: 63-75.
- Burlando, B., M. A. Sabatini und E. Gaino (1988): Association between calcareous *Clathrina cerebrum* (Haeckel) and bacteria: electron microscope study. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 116: 35-42.
- Burns, E., I. Ifrach, S. Carmeli, J. R. Pawlik und M. Ilan (2003): Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and Caribbean sponges. I. Chemical defense. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 252: 105-114.
- Burns, E. und M. Ilan (2003): Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and Caribbean sponges. II. Physical defense. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 252: 115-123.
- Carlile, M. J., S. C. Watkinson und G. W. Gooday (2001): *The fungi*. Academic Press, San Diego.
- Casiraghi, M, T. J. Anderson, C. Bandi, C. Bazzocchi und C. Genchi (2001): A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 122(1): 93-103.
- Cerrano, C., A. Arillo, G. Bavestrello, B. Calcinai, R. Cattaneo-Vietti, A. Penna, M. Sarà und C. Totti (2000): Diatom invasion in the Antarctic hexactinellid sponge *Scolymastra joubini*. *Polar Biol.* 23: 441-444.
- Chanas, B. und J. R. Pawlik (1995): Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 127: 195-211.
- Cheng, T. C., E. Rifkin und H. W. F. Yee (1968a): Studies of the internal defense mechanisms of sponges. II Phagocytosis and elimination of India ink and carmine particles by certain parenchymal cells of *Terpios zeteki*. *J. Invertebrate Pathol.* 11: 302-309.
- Cheng, T. C., H. W. F. Yee, E. Rifkin und M. D. Kramer (1968b): Studies on the internal defense mechanisms of sponges. III Cellular reactions in *Terpios zeteki* to implanted heterologous biological materials. *J. Invertebrate Pathol.* 12: 29-35.
- Christophersen, C., O. Crescente, J. C. Frisvad, L. Gram, J. Nielsen, P. H. Nielsen und L. Rahbaek (1999): Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia* 143: 135-138.
- Cottrell, M. T. und D. L. Kirchman (2000): Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5116-5122.
- Cuomo, V., E. B. G. Jones und S. Grasso (1988): Occurrence and distribution of marine fungi along the coast of the Mediterranean Sea. *Prog. Oceanog.* 21: 189-200.

- Daley, R. J. (1979): Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: uses, limitations and comparative accuracy. S. 29-45. In: J. W. Costerton und R. R. Colwell (Hrsg.): Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- De Rosa, S., A. Milone, A. Kujumgiev, K. Stefanov, I. Nechev und S. Popov (2000): Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/Alteromonas*, associated with the sponge *Dysidea fragilis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 126(3): 391-396.
- De Vos, L., K. Rützler, N. Boury-Esnault, C. Donadey und J. Veccelet (1991): Atlas of sponge morphology. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Decho, A. W. (2000): Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Cont. Shelf Res.* 20(10-11): 1257-1273.
- DeLong, E. F. (1992): Archae in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5685-5689.
- Doshida, J., H. Hasegawa, H. Onuki und N. Shimidzu (1996): Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. *J. Antibiot.* 49: 1105-1109.
- Dosse, G. (1940): Bakterien- und Pilzbefunde sowie pathologische und Fäulnisvorgänge in Meeres- und Süßwasserschwämmen. *Z. Parasitenkunde* 11: 331-356.
- Eimhjellen, K. E. (1967): Photosynthetic bacteria and carotinoids from the sea sponge *Halichondrium panicea*. *Acta Chem. Scan.* 21: 2280-2291.
- Eisen, J A, S. W. Smith und C. M. Cavanaugh (1992): Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Bacteriol.* 174(10): 3416-3421.
- EMBL: <http://www.ebi.ac.uk>.
- Erpenbeck, D., J. A. J. Breeuwer, H. C. van der Velde und R. W. M. van Soest (2002): Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Mar. Biol.* 141: 377-386.
- Faulkner, D. J., M. K. Harper, M. G. Haygood, C. E. Salomon und E. W. Schmidt (2000): Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. S. 107-119. In: N. Fusetani (Hrsg.): *Drugs of the sea*. Karger, Basel.
- Faulkner, D. J., M. K. Harper, C. E. Salomon und E. W. Schmidt (1999): Localisation of bioactive metabolites in marine sponges. *Mem. Queensl. Mus.* 44: 167-173.
- Fricke, B., K. Drößler, I. Willhardt, A. Schierhorn, S. Menge und P. Rücknagel (2001): The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. *Biochim. Biophys. Acta* 1537: 132-146.

- Friedrich, A. B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch und U. Hentschel (1999): Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar. Biol.* 134: 461-470.
- Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwipl, W. Ludwig und R. Amann (1998): Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4973-4982.
- Fuerst, J. A. (1995): The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiol.* 141: 1493-1506.
- Fuerst, J. A., R. I. Webb, M. J. Garson, L. Hardy und H. M. Reiswig (1998): Membrane-bounded nucleoids in microbial symbionts of marine sponges. *FEMS Microbiol. Lett.* 166(1): 29-34.
- Fuerst, J. A., R. I. Webb, M. J. Garson, L. Hardy und H. M. Reiswig (1999): Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.* 44: 193-203.
- Fuller, M. S. (1978): Lower Fungi in the laboratory. Department of Botany, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.
- Gabor, E. M., E. J. de Vries und D. B. Janssen (2003): Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44(2): 153-163.
- Gaertner, A. (1968): Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer, mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl.* 3: 105-120.
- Gaino, E., G. Bavestrello, R. Cattaneo-Vietti und M. Sarà (1994): Scanning electron microscope evidence for diatom uptake by two arctic sponges. *Polar Biol.* 14: 55-58.
- Gaino, E. und R. Pronzato (1987): Ultrastructural observations of the reaction of *Chondrilla nucula* (Porifera, Demospongiae) to bacterial invasion during degenerative processes. *Cah. Biol. Mar.* 28: 37-46.
- Gaino, E. und R. Pronzato (1989): Ultrastructural evidence of bacterial damage to *Spongia officinalis* fibres (Porifera, Demospongiae). *Dis. aquat. Org.* 6: 67-74.
- Gaino, E., R. Pronzato, G. Corriero und P. Buffa (1992): Mortality of commercial sponges: Incidence in two Mediterranean areas. *Boll. Zool.* 59: 79-85.
- Gallissian, M.-F. und J. Vacelet (1976): Ultrastructure de quelques stades de l'ovogenese de spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *Ann. Sci. Nat. Zool.* 18: 381-404.

- Gams, W., E. H. Hoekstra und A. Aptroot (1998): CBS course of mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.
- Garrone, R. (1978): Phylogenesis of connective tissue: morphological aspects and biosynthesis of sponges intercellular matrix. Karger, New York.
- Garson, M. J., A. E. Flowers, R. I. Webb, R. D. Charan und E. J. A. McCaffrey (1998): A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: cellular origin of cytotoxic alkaloids by percoll density gradient fractionation. Cell Tissue Res. 293(2): 365-373.
- Gatti, S., T. Brey, W. E. G. Müller, O. Heilmayer und G. Holst (2002): Oxygen microoptodes: a new tool for oxygen measurements in aquatic animal ecology. Mar. Biol. 140: 1075-1085.
- Genilloud, O., F. Pelaez, I. Gonzalez und M. T. Diez (1994): Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts. Microbiologia 10(4): 413-422.
- Gil-Turnes, M. S., M. E. Hay und W. Fenical (1989): Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. Science 246(4926). 116-118.
- Gil-Turnes M. S. und W. Fenical (1992): Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. Biol. Bull. 182: 105-108.
- Gillor, O., S. Carmeli, Y. Rahamim, Z. Fishelson und M. Ilan (2000): Immunolocalization of the toxin latrunculin B within the Red Sea sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae). Mar. Biotech. 2: 213-223.
- Giovannoni, S. und M. Rappé (2000): Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. S. 47-84. In: D. L. Kirchman (Hrsg.): Microbial ecology of the oceans. Wiley, New York.
- Gonzalez, J. M. und M. A. Moran (1997): Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. Appl. Environ. Microbiol. 63(11): 4237-4242.
- Grabowski, V. (2002): Nachweis und Charakterisierung von Actinobakterien und einigen Planctomycetales aus marinen Schwämmen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Green, G., P. Gomez und G. J. Bakus (1990): Antimicrobial and ichthyotoxic properties of marine sponges from Mexican waters. S. 109-114. In K. Rützler (Hrsg.): New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C..
- Grocott, R. G. (1955): A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methanamine-silver nitrate technic. Amer. J. clin. Path. 25: 975-979.

- Gross, J., Z. Sokal und M. Rougvie (1956): Structural and chemical studies on the connective tissue of marine sponges. *J. Histochem. Cytochem.* 4: 227-246.
- Harrington, D. J. (1996): Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* 64(6): 1885-1891.
- Hartman, W. D. (1983): Porifera. p. 641-666. In S. P. Parker (Hrsg.): Synopsis and classification of living organisms. McGraw-Hill, New York.
- Henrikson, A. A. und J. R. Pawlik (1995): A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194: 157-165.
- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert und J. Hacker (2001): Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 305-311.
- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker und B. S. Moore (2002): Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9): 4431-4440.
- Hill, M. S. (1996): Symbiotic zooxanthellae enhance boring and growth rates of the tropical sponge *Anthosigmella varians* forma *varians*. *Mar. Biol.* 125: 649-654.
- Hiort, J. (2002): Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres. Isolierung, Strukturaufklärung und Evaluierung der biologischen Aktivität. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Höhnk, W. und A. Ulken (1979): Pilze aus marinen Schwämmen. Veröff. Inst. Meerresf. Bremerh. 17: 199-204.
- Hold, G. L., E. A. Smith, M. S. Rappé, E. W. Maas, E. R. B. Moore, C. Stroempl, J. R. Stephen, J. I. Prosser, T. H. Birkbeck und S. Gallacher (2001): Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37(2): 161-173.
- Höller, U., G. M. König und A. D. Wright (1999): A new tyrosine kinase inhibitor from a marine isolate of *Ulocladium botrytis* and new metabolites from the marine fungi *Asteromyces cruciatus* and *Varicosporina ramulosa*. *Eur. J. Org. Chem.* 1999: 2949-2955.
- Höller, U., A. D. Wright, G. F. Matthée, G. M. König, S. Draeger, H.-J. Aust und B. Schulz (2000): Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol. Res.* 104: 1354-1365.
- Holmes, A. J., N. A. Tujula, M. Holley, A. Contos, J. M. James, P. Rogers und M. R. Gillings (2001): Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ. Microbiol.* 3(4): 256-264.

- Hugenholtz, P., B. M. Goebel und N. R. Pace (1998): Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- Hugenholtz, P., G. W. Tyson und L. L. Blackall (2002): Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol. Biol.* 179: 29-42.
- Hummel, H., A. B. J. Sepers, L. de Wolf und F. W. Melissen (1988): Bacterial growth on the marine sponge *Halichondria panicea* induced by reduced waterflow rate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 42: 195-198.
- Huysecom, J., G. van de Vyver, J.-C. Braekman und D. Dalozze (1990): Chemical defense in sponges from North Brittany. S. 115-118. In K. Rützlet (Hrsg.): *New perspectives in sponge biology*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C..
- Hyde, K. D., E. B. G. Jones, E. Leaña, S. B. Pointing, A. D. Poonyth und L. L. P. Vrijmoed (1998): Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiv. Conserv.* 7: 1147-1161.
- Imhoff, J. F. und H. G. Trüper (1976): Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic bacteria. *Microb. Ecol.* 3: 1-9.
- Ivanova, E. P., T. A. Kuznetsova und V. V. Mikhailov (2000): Antifungal compounds produced by bacterial populations of the sea sponge *Verongia sp.*. *Russ.J. Mar. Biol.* 26: 118-119.
- Jayatilake, G. S., M. P. Thornton, A. C. Leonard, J. E. Grimwade und B. J. Baker (1996): Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* 59(3): 293-296.
- Jenkins, K. M., S. G. Toske, P. R. Jensen und W. Fenical (1998): Solanapyrones E-G, anti-algal metabolites produced by a marine fungus. *Phytochem.* 49: 2299-2304.
- Jensen, P. R. und W. Fenical (2000): Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. p. 6-29. In N. Fusetani (Hrsg.): *Drugs from the sea*. Karger, Basel.
- Johnson, T. W. und F. K. Sparrow (1961): *Fungi in oceans and estuaries*. Cramer, Weinheim.
- Joint, I., K. Tait, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Milton, P. Williams und M. Camara (2002): Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science* 298(5596): 1207.
- Jones, E. B. G. und P. R. Jensen (1999): What is a marine fungus? p. 107. In *Abstracts of the 7th Marine and Freshwater Mycology Symposium*. City University, Hong Kong.
- Junqua, S., L. Robert, R. Garrone, M. Pavans de Ceccatty und J. Vacelet (1974): Biochemical and morphological studies on collagens of horny sponges. *Ircinia* filaments compared to spongines. *Connect. Tissue Res.* 2: 193-203.

- Kagawa, T. F., J. C. Cooney, H. M. Baker, S. McSweeney, M. Liu, S. Gubba, J. M. Musser und E. N. Baker (2000): Crystal structure of the zymogen form of the group A *Streptococcus* virulence factor SpeB: an integrin-binding cysteine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(5): 2235-2240.
- Kelecom, A. (2002): Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74(1): 151-170.
- Kim, S., R. G. Labbe und S. Ryu (2000): Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3): 1213-1215.
- Kirk, P. W. (1980): The mycostatic effect of seawater on spores of terrestrial and marine higher fungi. *Bot. Mar.* 23: 133-238.
- Kohlmeyer, J. und E. Kohlmeyer (1979): *Marine mycology*. Academic Press, New York.
- Kohlmeyer, J. und B. Volkmann-Kohlmeyer (1987): Koralionastetaceae fam. nov. (Ascomycetes) from coral rock. *Mycologia* 79: 764-778.
- Kohlmeyer, J. und B. Volkmann-Kohlmeyer (1990): New species of *Koralionastes* (Ascomycotina) from the Caribbean and Australia. *Can. J. Bot.* 68: 1554-1559.
- Kohlmeyer, J. (1974): Higher fungi as parasites and symbionts of algae. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl.* 5: 339-356.
- König, G. M. und A. D. Wright (1996): Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta med.* 62: 193-211.
- Koukouras, A., A. Russo, E. Voultsiadou-Koukoura, C. Arvanitidis und D. Stefanidou (1996): Macrofauna associated with sponge species of different morphology. *Mar. Ecol.* 17: 569-582.
- Koukouras, A., A. Russo, E. Voultsiadou-Koukoura, C. Dounas und C. Chintiroglou (1992): Relationship of sponge macrofauna with the morphology of their hosts in the North Aegean Sea. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 77: 609-619.
- Kraus, D. W., J. E. Doeller und C. S. Powell (1996): Sulfide may directly modify cytoplasmic hemoglobin deoxygenation in *Solemya reidi* gills. *J. Exp. Biol.* 199: 1343-1352.
- Krueger, D. M. und C. M. Cavanaugh (1997): Phylogenetic diversity of bacterial symbionts of *Solemya* hosts based on comparative sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1): 91-98.
- Kunzmann, K. (1996): Die mit ausgewählten Schwämmen (Hexactinellida und Demospongiae) aus dem Weddelmeer, Antarktis, vergesellschaftete Fauna. *Ber. Polarforsch.* 210: 1-93.

- Larkum, A. W. D., G. C. Cox, R. G. Hiller, D. L. Parry und T. P. Dibbayawan (1987): Filamentous cyanophytes containing phycourobilin and in symbiosis with sponges and an ascidian of coral reefs. *Mar. Biol.* 95: 1-13.
- Lauckner, G. (1980): Diseases of Porifera. S. 139-165. In: O. Kinne (Hrsg.): Diseases of marine animals. Wiley and Sons, Chichester.
- Lepore, E., M. Sciscioli, M. Gherardi und L. Scalera Liaci (1995): The ultrastructure of the mature oocyte and the nurse cells of the ceractinomorpha *Petrosia ficiformis*. *Cah. Biol. Mar.* 36: 15-20.
- Lévi, C. (1950): Remarques sur la faune des Spongiaires de Roscoff. *Arch. Zool. Expér. Gén.* 87: 10-21.
- Liang, P. und A. B. Pardee (1997): Differential display methods and protocols. Humana Press, Totowa.
- Lindsay, M. R., R. I. Webb und J. A. Fuerst. (1997): Pirellulosomes: a new type of membrane bounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *Pirellula*. *Microbiol.* 143: 739-748.
- Lindsay, M. R., R. I. Webb, M. Strous, M. S. Jetten, M. K. Butler, R. J. Forde, und J. A. Fuerst (2001): Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.* 175(6): 413-429.
- Loy, A., M. Horn und M. Wagner (2003): probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 31: 514-516.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko und J. Parker (2000): Mikrobiologie. Spektrum, Berlin.
- Madri, P. P., M. Hermel und G. Claus (1971): The microbial flora of the sponge *Microciona prolifera* VERRIL and its ecological implications. *Bot. Mar.* 14: 1-5.
- Malmstrøm, J., C. Christophersen, A. F. Barrero, J. E. Oltra, J. Justicia und A. Rosales (2002): Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Emericella varicolor*. *J. Nat. Prod.* 65(3): 364-367.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner und K.-H. Schleifer (1992): Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclass of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Manz, W., G. Arp, G. Schumann-Kindel, U. Szewzyk und J. Reitner (2000): Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Methods* 40: 125-134.
- Margot, H., C. Acebal, E. Toril, R. Amils und J. L. Fernandez Puentes (2002): Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.* 140: 739-745.

- Mariani, S., M.-J. Uriz und X. Turon (2000): Larval bloom of the oviparous sponge *Cliona viridis*: coupling of larval abundance and adult distribution. *Mar. Biol.* 137: 783-790.
- Martin, A. P. (2002): Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8): 3673-3682.
- Masuma, R., Y. Yamaguchi, M. Noumi, S. Omura und M. Namikoshi (2001): Effect of sea water concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in marine fungi. *Mycoscience* 42: 455-459.
- McCaffrey, E. J. und R. Endean (1985): Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Mar. Biol.* 89: 1-8.
- Meier, H., R. Amann, W. Ludwig und K.-H. Schleifer (1999): Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 186-196.
- Meyers, S. P. (1968): Observations on the physiological ecology of marine fungi. *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto University* 12: 207-225.
- Minz, D., S. Fishbain, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, B. E. Rittmann und D. A. Stahl (1999a): Unexpected population distribution in a microbial mat community: sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4659-4665.
- Minz, D., J. L. Flax, S. J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, M. Wagner, B. E. Rittmann und D. A. Stahl (1999b): Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4666-4671.
- Moeseneder, M. M., C. Winter und G. J. Herndl (2001): Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnol. Oceanogr.* 46: 95-107.
- Mohapatra, B. R., U. C. Banerjee und M. Bapuji (1998): Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J. of Biotechnol.* 60: 113-117.
- Moissl, C., C. Rudolph und R. Huber (2002): Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 933-937.
- Morris, R. M., M. S. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, W. A. Siebold, C. A. Carlson, und S. J. Giovannoni (2002): SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420: 806-810.
- Mülhardt, C. (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.

- Müller, W. E. G. (2001): Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 129(2-3): 433-460.
- Müller, W. E. G. und H. C. Schröder (1997): Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln. *Biologie in unserer Zeit* 27: 389-398.
- Müller, W. E. G., R. Zahn, B. Kurelec, C. Lucu, I. Müller und G. Uhlenbruck (1981): Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *J. Bacteriol.* 145: 548-558.
- Muricy, G., E. Hajdu, F. V. Araujo und A. N. Hagler (1993): Antimicrobial activity of Southwestern Atlantik shallow-water marine sponges (Porifera). *Sci. Mar.* 57: 427-432.
- Muyzer, G., E. C. de Waal und A. G. Uitterlinden (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3): 695-700.
- Muyzer, G., A. Teske, C. O. Wirsen und H. W. Jannasch (1995): Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol* 164: 165-172.
- Muyzer, G. und K. Smalla (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(1): 127-141.
- Neef, A. (1997): Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Dissertation, Technische Universität München.
- Neef, A., R. Amann, H. Schlesner und K.-H. Schleifer (1998): Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiol.* 144 (12): 3257-3266.
- Newell, S. Y. (1996): Established and potential impacts of eukaryotic mycelia decomposers in marine / terrestrial ecotones. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 200: 187-206.
- Newton, C. R. und A. Graham (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Olson, J. B, D. K. Harmody und P. J. McCarthy (2002): Alpha-proteobacteria cultivated from marine sponges display branching rod morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* 211(2): 169-173.
- Osinga, R., J. Tramper und R. H. Wijffels (1999): Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotechnol.* 1: 509-532.

- Ovechkina, Y. Y., R. K. Pettit, Z. A. Cichacz, G. R. Pettit und B. R. Oakley (1999): Usual antimicrotubule activity of the antifungal agent Spongiastin 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1993-1999.
- Perez, T., J. Garrabou, S. Sartoretto, J.-G. Harmelin, P. Francour und J. Vacelet (2000): Mortalité massive d'invertébrés marins: un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale: Mass mortality of marine invertebrates: an unprecedented event in the Northwestern Mediterranean. *C. R. Sciences Acad. Sci. III* 323(10): 853-865.
- Peters, E. C. (1993): Diseases of other invertebrate phyla: porifera, cnidaria, ctenophora, annelida, echinodermata. S. 393-449. In: J. A. Couch and J. W. Fournie (Hrsg.): *Pathobiology of marine and estuarine organisms*. CRC Press, Boca Raton.
- Pettit, R. P., S. C. McAllister, G. R. Pettit, C. L. Herald, J. M. Johnson und Z. A. Cichacz (1998): A broad-spectrum antifungal from the marine sponge *Hyrtios erecta*. *Int. J. Antimicro. Ag.* 9: 147-152.
- Pietra, F. (1997): Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. *Achievements and prospects*. *Nat. Prod. Rep.*: 453-463.
- Pitt, J. I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Preston, C. M., K. Y. Wu, T. F. Molinski und E. F. DeLong (1996): A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6241-6246.
- Priess, K., T. Le Campion-Alsumard, S. Golubic, F. Gadel und B. A. Thomassin (2000): Fungi in corals: black bands and density-banding of *Porites lutea* and *P. lobata* skeleton. *Mar. Biol.* 136: 19-27.
- Pronzato, R., G. Bavestrello, C. Cerrano, G. Magnino, R. Manconi, J. Pantelis, A. Sarà und M. Sidri (1999): Sponge farming in the Mediterranean Sea: New perspectives. *Mem. Queensl. Mus.* 44: 485-491.
- Raghukumar, S. (1988): Detection of the thraustochytrid protist *Ulkenia visurgensis* in a hydroid, using immunofluorescence. *Mar. Biol.* 97: 253-258.
- Raghukumar, S. (2002): Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *Europ. J. Protistol.* 38: 127-145.
- Raper, K. B. und D. I. Fennell (1965): The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Rappé, M. S., K. Vergin und S. J. Giovannoni (2000): Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 219-232.

- Ravenschlag, K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jørgensen und R. Amann (2000): Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8): 3592-3602.
- Regoli, F., C. Cerrano, E. Chierici, S. Bompadre und G. Bavestrello (2000): Susceptibility to oxidative stress of the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance. *Mar. Biol.* 137: 453-461.
- Reiswig, H. M. (1971): *In situ* pumping activities of tropical Demospongiae. *Mar. Biol.* 9: 38-50.
- Ribes, M., R. Coma und J.-M. Gili (1999): Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Mar. Ecol.* 176: 179-190.
- Ribosomal Database Projekt II: <http://rdp.cme.msu.edu/html>.
- Richter, W. (1985): Marine Schwämme als Substrat für Thraustochytriaceae (marine niedere Pilze). *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* 20: 141-149.
- Roche, J. und M. Eysseric-Lafon (1951): Recherches sur la biochimie comparée des spongiens. *Bull. Sté. Chim. Biol.* 33: 1448-1455.
- Roller, C, M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig und K. H. Schleifer (1994): In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiol.* 140 (10): 2849-2858.
- Rosell, D. (1993): Effects of reproduction in *Cliona viridis* (Hadromerida) on zooxanthellae. *Sci. Mar.* 57: 405-413.
- Roth, F. J. Jr., D. G. Ahearn, J. W. Fell, S. P. Meyers und S. A. Meyer (1962): Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limnol. Oceanogr.* 7: 178-185.
- Rudolph, C., G. Wanner und R. Huber (2001): Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5): 2336-2344.
- Rützler, K. (1985): Association between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. S. 455-466. In: K. Rützler (Hrsg.): *New perspectives in sponge biology*. Smithsonian Institution Press, Washington D. C..
- Rützler, K. (1988): Mangrove sponges diseases induced by cyanobacterial symbionts: failure of a primitive immune system? *Dis. aquat. Org.* 5: 143-149.
- Rützler, K. und K. Muzik (1993): *Terpios hoshinota*, a new cyanobacteriosponge threatening Pacific reefs. *Sci. Mar.* 57: 395-403.
- Sahm, K., B. J. MacGregor, B. B. Jørgensen und D. A. Stahl (1999): Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ. Microbiol.* 1(1): 65-74.

- Sallenave-Namont, C., Y. F. Pouchus, T. Robiou du Pont, P. Lassus und J. F. Verbist (2001): Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia* 149: 21-25.
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad und O. Filtenborg (2000): Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Sanford, R. A., J. R. Cole und J. M. Tiedje (2002): Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 893-900.
- Santavy, D. L. und R. R. Colwell (1990): Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67: 73-82.
- Santavy, D L, P. Willenz und R. R. Colwell (1990): Phenotypic study of bacteria associated with the caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *App. Environ. Microbiol.* 56(6): 1750-1762.
- Sarà, M., G. Bavestrello, R. Cattaneo-Vietti und C. Cerrano (1998): Endosymbiosis in sponges: relevance for epigenesis and evolution. *Symbiosis* 25: 57-70.
- Sarà, M., E. Gaini und F. Valentini (1973): Nouvelles donnees sur les associations entre sponges et bacteries. *Comm. Int. Explor. Sci. Mer. Mediterr.* 22: 97-98.
- Sata, N. U., S. Matsunaga, N. Fusetani und R. W. M. van Soest (1999): Aurantosides D, E, and F: New antifungal tetramic acid glycosides from the marine sponge *Siliquariaspongia japonica*. *J. Nat. Prod.* 62: 969-971.
- Schaumann, K. (1974): Zur Verbreitung saprophytischer höherer Pilzkeime in der Hochsee. Erste quantitative Ergebnisse aus der Nordsee und dem NO-Atlantik. *Veröff. Inst. Meeresforsch., Bremerh. Suppl.* 5: 287-300.
- Schaumann, K. (1993): Marine Pilze. S. 144-195. In: L.-A. Meyer-Reil und M. Köster (Hrsg.): *Mikrobiologie des Meeresbodens*. Gustav Fischer, Jena.
- Schleper, C., E. F. DeLong, C. M. Preston, R. A. Feldmann, K.-Y. Wu und R. V. Swanson (1998): Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* 180: 5003-5009.
- Schmidt, E. W., A. Y. Obratzsova, S. K. Davidson, D. J. Faulkner und M. G. Haygood (2000): Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel gamma-proteobacterium, "*Candidatus* Enthotheonella palauensis". *Mar. Biol.* 136: 969-977.
- Schmitz, F. J. (1994): Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. S. 485-496. In: R. W. M. van Soest, T. M. G. van Kempen und J.-C. Braekman (Hrsg.): *Sponges in time and space*. A. A. Balkema, Rotterdam.

- Schulz, B., U. Wanke, S. Draeger und H.-J. Aust (1993): Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 97: 1447-1450.
- Schumann-Kindel, G., M. Bergbauer, W. Manz, U. Szewzyk und J. Reitner (1997): Aerobic and anaerobic microorganisms in modern sponges: a possible relationship to fossilization-processes. *Facies* 36: 268-272.
- Schwieger, F. und C. C. Tebbe (1998): A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4870-4876.
- Sciscioli, M., E. Lepore, G. Corriero und L. Scalera-Liaci (1997): Ultrastructural organisation of choanocyte chamber in the haplosclerid *Pellina semitubulosa* (Porifera, Demospongiae): a cue for water flow into the sponge body. *Ital. J. Zool.* 64: 291-296.
- Sciscioli, M., E. Lepore, M. Gherardi und L. Scalera Liaci (1994): Transfer of symbiotic bacteria in the mature oocyte of *Geodia cydonium* (Porifera, Demospongiae): an ultrastructural study. *Cah. Biol. Mar.* 35: 471-478.
- Sciscioli, M., E. Lepore, M. Mastrodonato, L. Scalera Liaci und E. Gaino (2002): Ultrastructural study of the mature oocyte of *Tethya aurantium* (Porifera: Demospongiae). *Cah. Biol. Mar.* 43: 1-7.
- Shimizu, T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara und H. Hayashi (2002): Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(2): 996-1001.
- Siepmann, R. und W. Höhnk (1962): Über Hefen und einige Pilze (Fungi imp., Hyphales) aus dem Nordatlantik. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* 8: 79-97.
- Sigalevich, P., M. V. Baev, A. Teske und Y. Cohen (2000a): Sulfate reduction and possible aerobic metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxycyclinae* in a chemostat coculture with *Marinobacter sp.* strain MB under exposure to increasing oxygen concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11): 5013-5018.
- Sigalevich, P. und Y. Cohen (2000): Oxygen-dependent growth of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxycyclinae* in coculture with *Marinobacter sp.* strain MB in an aerated sulfate-depleted chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11): 5019-5023.
- Sigalevich, P., E. Meshorer, Y. Helman und Y. Cohen (2000b): Transition from anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxycyclinae* results in flocculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5005-5012.
- Silva, M. C. und C. A. Batt (1995): Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency. *Mol. Ecol.* 4(1): 11-16.
- Simpson, T. L. (1984): *The cell biology of sponges.* Springer, New York.

- Smith, F. G. W. (1941): Sponge disease in British Honduras, and its transmission by water currents. *Ecology* 22: 415-421.
- Soltwedel, T. und K. Vopel (2001): Bacterial abundance and biomass in response to organism-generated habitat heterogeneity in deep-sea sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 219: 291-298.
- Sorokin, D. Y., A. Teske, L. A. Robertson und J. G. Kuenen (1999): Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30(2): 113-123.
- Sponga, F., L. Cavaletti, A. Lazzarini, A. Borghi, I. Ciciliato, D. Losi und F. Marinelli (1999): Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. Biotechnol.* 70: 65-69.
- Stahl, D. A. und R. Amann (1991): Development and application of nucleic acid probes. S. 205-248. In: E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.): *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Stierle, A. C. und J. H. Cardellina (1988): A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44: 1021.
- Strous, M, J. A. Fuerst, E.H. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. T. van de Paschoonen, R. Webb, J. G. Kuenen und M. S. Jetten (1999): Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446-449.
- Swatschek, D., W. Schatton, J. Kellermann, W. E. G. Müller und J. Kreuter (2002): Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 53(1): 107-113.
- TeStrake, D. und H. C. Aldrich (1984): Ultrastructure of two associations involving marine fungi and green algae. *Bot. Mar.* 27: 515-519.
- Thacker, R. W. und S. Starnes (2003): Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* in marine sponges, *Dysidea* spp.. *Mar. Biol.* 142: 643-648.
- Thakur, N. L. und A. C. Anil (2000): Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: Importance of its surface-associated bacteria. *J. Chem. Ecol.* 26(1): 57-71.
- Thompson, J. E., R. P. Walker und D. J. Faulkner (1985): Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Mar. Biol.* 88: 11-21.
- Torres, Y. R., R. G. S. Berlinck, G. G. F. Nascimento, S. C. Fortier, C. Pessoa und M. O. de Moraes (2002): Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon* 40: 885-891.

- Toske, S. G., P. R. Jensen, C. A. Kauffman und W. Fenical (1998): Aspergillamides A and B: modified cytotoxic tripeptides produced by a marine fungus of the genus *Aspergillus*. *Tetrahedron* 54(44): 13459-13466.
- Tran, L. H. und H. Nagano (2002): Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. *J. Food Sci.* 67: 1184-1187.
- Trautman, D. A., R. Hinde und M. A. Borowitzka (2000): Population dynamics of an association between a coral reef sponge and a red macroalga. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 244: 87-105.
- Tsoukatou, M., C. Hellio, C. Vagias, C. Harvala und V. Roussis (2001): Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Z. Naturforsch.* 57: 161-171.
- Turon, X., J. Galera und M. J. Uriz (1997): Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J. Exp. Zool.* 278: 22-36.
- Ui, H., K. Shiomi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, T. Nagamitsu, D. Takano, T. Sunazuka, M. Namikoshi und S. Omura (2001): Nafuredin, a novel inhibitor of NADH-fumarate reductase, produced by *Aspergillus niger* FT-0554. *J. Antibiot.* 54(3): 234-238.
- Unson, M. D., N. D. Holland und D. J. Faulkner (1994): A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* 119: 1-11.
- Uriz, M. J., M. A. Becerro, J. M. Tur und X. Turon (1996): Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Mar. Biol.* 124: 583-590.
- Uriz, M. J., D. Martin, X. Turon, E. Ballesteros, R. Hughes und C. Acebal (1991): An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70: 175-188.
- Usher, K. M., J. Kuo, J. Fromont und D. C. Sutton (2001): Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* 461: 15-23.
- Vacelet, J. und N. Boury-Esnault (1995): Carnivorous sponges. *Nature* 373: 333-335.
- Vacelet, J. und N. Boury-Esnault (2002): A new species of carnivorous deep-sea sponge (Demospongiae: Cladorhizidae) associated with methanotrophic bacteria. *Cah. Biol. Mar.* 43: 141-148.
- Vacelet, J. und C. Donadey (1977): Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 30: 301-314.
- Vacelet, J., A. Fiala-Médioni, C. R. Fisher und N. Boury-Esnault (1996): Symbiosis between methane-oxidizing bacteria and a deep-sea carnivorous cladorhizid sponge. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 145: 77-85.

- Vacelet, J., E. Vacelet, E. Gaino und M.-F. Gallissian (1994): Bacterial attack of spongin skeleton during the 1986-1990 Mediterranean sponge disease. S. 355-362. In: R. W. M. van Soest, T. M. G. van Kempen und J.-C. Braekman (Hrsg.): Sponges in time and space. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Van Noorden, C. J. F. und W. M. Frederiks (1992): Enzyme histochemistry: a laboratory manual of current methods. Oxford University Press, New York.
- van Soest R. W. M., B. Picton und C. Morrow (2000): Sponges of the North East Atlantik. World biodiversity database CD-ROM series. Springer, Heidelberg.
- Varoglu, M., T. H. Corbett, F. A. Valeriote und P. Crews (1997): Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*. J. Org. Chem. 62: 7078-7079.
- Venkatesan, T. (1990): Biodegradation by marine fungi. S. 140-147. In: Ramachandran, S. und S. Rajogopal: Current trends in coastal marine science: a special collection of papers to felicitate Prof. R. Natarajan on his 60th Birthday.
- Vicente, V. P. (1989): Regional commercial sponge extinctions in the West Indies: are recent climatic changes responsible? Mar. Ecol. 10: 179-191.
- Vogel, S. und W. L. Bretz (1971): Interfacial organisms: passive ventilation in the velocity gradients near surface. Science 175: 210-211.
- von Arx, J. A. (1974): The genera of fungi sporulating in pure cultures. A. R. Gantner Verlag, Vaduz.
- von Wintzingerode, F, U. B. Göbel und E. Stackebrandt (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 21(3): 213-229.
- Wahl, M. (1989): Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. Mar. Ecol. Prog. Ser. 58: 175-189.
- Walker, R. P., J. E. Thompson und D. J. Faulkner (1985): Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II Chemical evidence. Mar. Biol. 88: 27-32.
- Wallner, G., R. Amann und W. Beisker (1993): Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry 14: 136-143.
- Webb, V. L. und E. W. Maas (2002): Sequence analysis of 16S rRNA gene of cyanobacteria associated with the marine sponge *Mycale (Carmia) hentscheli*. FEMS Microbiol. Lett. 207: 43-47.
- Webster, N. S. und R. T. Hill (2001): The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -proteobacterium. Mar. Biol. 138(4): 843-851.

- Webster, N. S., A. P. Negri, R. I. Webb und R. T. Hill (2002): A spongin-boring alpha-proteobacterium is the etiological agent of disease in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 232: 305-309.
- Webster, N. S., J. E. M. Watts und R. T. Hill (2001a): Detection and phylogenetic analysis of novel crenarchaeote and euarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier Reef sponge. Mar. Biotechnol. 3: 600-608.
- Webster, N. S., K. J. Wilson, L. L. Blackal und R. T. Hill (2001b): Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 434-444.
- Weissenfels, N. (1989): Biologie und mikroskopische Anatomie der Süßwasserschwämme (Spongillidae). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Weyland, H. (1981): Distribution of actinomycetes on the sea floor. Actinomycetes, Zbl. Bakt. Suppl. 11: 185-193.
- Whitehead, N. A., A. M. L. Barnard, H. Slater, N. J. L. Simpson und G. P. C. Salmond (2001): Quorum-sensing in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25(4): 365-404.
- Wickerham, L. J. (1951): Taxonomy of yeasts. U. S. Dept. Tech. Bull. 1029: 1-56.
- Wiens, M., B. Luckas, F. Brümmer, M. Shokry, A. Ammar, R. Steffen, R. Batel, B. Diehl-Seifert, H. C. Schröder und W. E. G. Müller (2003): Okadaic acid: a potential defense molecule for the sponge *Suberites domuncula*. Mar. Biol. 142: 213-223.
- Wilkinson, C. R. (1978a): Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of Coral Reef Sponges. Mar. Biol. 49: 161-167.
- Wilkinson, C. R. (1978b): Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. Mar. Biol. 49: 169-176.
- Wilkinson, C. R. (1978c): Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in Coral Reef Sponges. Mar. Biol. 49: 177-185.
- Wilkinson, C. R. (1983): Net primary productivity in coral reef sponges. Science 219: 410-412.
- Wilkinson, C. R. (1987): Significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology. Symbiosis 4: 135-146.
- Wilkinson, C. R. (1992): Symbiotic interactions between marine sponges and algae: S. 111-151. In: W. Reisser (Hrsg.): Algae and symbiosis: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored. Biopress, Bristol.
- Wilkinson, C. R., R. Garrone und D. Herbage (1979): Sponge collagen degradation *in vitro* by sponge-specific bacteria. S. 361-364. In: C. Lévi und N. Boury-Esnault (Hrsg.): Biologie des Spongiaires. C.N.R.S., Paris.

- Wilkinson, C. R., R. Garrone und J. Vacelet (1984): Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. Proc. R. Soc. Lond. B 220: 519-528.
- Wilkinson, C. R., M. Nowak, B. Austin und R. R. Colwell (1981): Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. Microb. Ecol. 7: 13-21.
- Witte, U., T. Brattegard, G. Graf und B. Springer (1997): Particle capture and deposition by deep-sea sponges from the Norwegian-Greenland Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 154: 241-252.
- Worasatit, N., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti und C. Rowland (1994): Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. Mycol. Res. 98: 1357-1363.
- Zheng, Z., W. Zeng, Y. Huang, Z. Yang, J. Li, H. Cai und W. Su (2000): Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiol. Lett. 188(1): 87-91.
- Ziebis, W., M. Huettel und S. Forster (1996): Impact of biogenic sediment topographie on oxygen fluxes in permeable seabeds. Mar. Ecol. Prog. Ser. 140:227-237.

8 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
a. dest.	destilliertes Wasser
a. bidest.	doppelt destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CTAB	Hexadecyltrimethyl-ammonium-bromide
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	dissolved organic carbon, gelöster organischer Kohlenstoff
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
forw.	forward, vorwärts gerichtet
G	Guanin
h	Stunde/Stunden
ICM	Intrazytoplasmatische Membran
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
LM	Lichtmikroskop
Lsg.	Lösung
M	Molar
min	Minuten
MQ	Milli Q, hochgereinigtes Wasser
n.b.	nicht bestimmt

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphatpuffer (phosphat buffert saline)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rev.	reverse, rückläufig
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunden
SSCP	Einzelstrang Konformationspolymorphismus (single strand conformation polymorphism)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TB	Toluidin Blau
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (Unit) bei Mengenangaben von Enzymen
X-Gal	5-Brom-4-Chloro- 3-indolyl-β-D-galactosid
z.T.	zum Teil
µm	Mikrometer

9 Anhang

A1 Benutzte Isolationsmedien für Pilze:

Czapeks Hefe Agar

3g NaNO₃

1g K₂HPO₄

10ml Mineral Lösung (MS):

5g KCl

5g MgSO₄+7H₂O

0,1 g FeSO₄+7H₂O

in 100ml H₂O

5 g Hefe Extract

30 g Saccharose

1 ml Spurenstoff-Lösung (TMS):

1 g ZnSO₄+7H₂O

0,5 g CuSO₄+5H₂O

in 100 ml H₂O

ad 1L Seewasser

10g/L Agar

ph 7,0-7,2

Malz Extract Agar

Kommerziell: MEA von der Firma Oxid

Schwamm-Extrakt Agar

100g Schwamm (*Geodia baretii* Bowerkank, 1858) in kleine Stücke zerschnitten und in 1L Seewasser für 30 min gekocht, anschließend abfiltriert

Filtrat + 12g Agar

pH 7,2

Schwamm Skelett Agar

100g ausgekochter Schwamm, Rest von Mediumansatz SEA, mit Ultraturrax weiter zerkleinert

+ 500 ml Seewasser

+ 20g Agar

pH 7,2

Sabouraud Dextrose Agar

10g/L Pepton (Difco)

20g/L Dextrose

1g/L MgSO₄*7H₂O

1g/L KH₂PO₄

20g/L Bacto Agar (Difco)

pH 7,2

Potatoe Dextrose Agar

PDA von Difco
20 g Glucose
10-20g/L Agar
pH 6,6

Cellulose Hefe Agar

10 g/l Cellulose
1 g/l Hefe Extrakt
15 g/l Agar
pH 7,2

Wickerham Agar

10 g/L Glucose
5 g/L Pepton
3 g/L Hefeextrakt
20 g/L Agar
pH 7,2

Glukose-Pepton-Hefe-Ammoniumnitrat Agar

1 g/L Glukose
0,5 g/L Pepton
0,1 g/L Hefeextrakt
1 g/L Ammoniumnitrat
16 g/L Agar
pH 7,2

A2 Benutzte Isolationsmedien für Bakterien:**Malz-Yeast-Agar**

4g/L Hefeextrakt
10g/L Malz Extrakt
4g/L Glukose
10g/L Agar
pH 7,3

Nutrient Broth-Agar

Nutrient Broth (Merck)
12g/L Agar

Alle Kulturen wurden mit 30‰ Meerwasser angesetzt. Bei der Pilzisolierung aus den Schwammproben und den anderen Umweltproben wurde die Medien mit Penicillin (0,1g/L) und Streptomycin (0,1g/L) angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, dann waren die Chemikalien von der Firma Merck. Medien nach Wickerham (1951), Schaumann (1974), Weyland (1981) und Gams et al. (1998).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Wilbert und Herrn Prof. Dr. Dr. Hans G. Trüper für die Betreuung dieser Arbeit und ihre guten Hinweisen, die meine Sichtweise der Thematik erweitert haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karsten Schaumann für die Ermöglichung der Mitarbeit im „Schwammprojekt“ am Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven, die Einführung in das „Reich der Pilze“ und für die Freiheit, auch vom Projekt unabhängige Themen für diese Promotion bearbeiten zu können.

Dank gilt Herrn Prof. Dr. Victor Smetacek und Herrn Prof. Dr. Gerhard Kattner für ihr Engagement zu meiner Vertragsverlängerung.

Den Mitgliedern der AG Marine Mykologie danke ich für das gute Miteinander. Mein besonderer Dank gilt Tom Gräfenhan für zahlreiche Hinweise zur Pilzbestimmung und Kultivierung. Monika Schnibbe und Kerstin Scheer danke ich für die Unterstützung der mykologischen Kultivierungsarbeiten; Frau Lücker für ihre Hilfe bei der Bestimmung der pilzähnlichen Protisten.

Frau Dr. Robin Brinkmeyer danke ich herzlich für viele Hilfen und praktische Anleitungen bei diversen molekularbiologischen Fragen.

Für die uneingeschränkte Nutzungsmöglichkeit ihrer Labore, anregende Diskussionen und Motivation, wenn so manches verloren schien, möchte ich ganz herzlich Frau Dr. Elisabeth Helmke danken.

Herrn Dr. Frank Poppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit am Elektronenmikroskop, vielfältige Hilfen und so manches schöne Ausklingen eines langen Arbeitstages am Deich herzlich danken.

Frau Dr. Linda Medlin danke ich dafür, ihre Genetiklabore nutzen zu können.

Den Mitgliedern der AG Medlin möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Besonders danke ich Dr. Uwe John, Dr. Thomas Mock und Dr. Klaus Valentin für viele gute Ratschläge und Einführungen in diverse molekularbiologische Methoden, ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden wäre. Dr. Gundula Eller gilt Dank für die Einführung in das ARB Computerprogramm

Frau Dr. Ute Hentschel, sowie Anja Friedrichs und Lars Fieseler (Universität Würzburg) danke ich für die Einführung in die FISH-Methode an Schwammschnitten und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Kerstin Beyer, Jutta Jürgens, Helga Mehl, Ute Bock und Friedel Hintz am Alfred-Wegener-Institut danke ich für ihre Hilfen, die das Arbeiten sehr erleichtert haben und die Nutzungsmöglichkeit der Elektronenmikroskope.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des „Schwamm-Projektes“ und die schönen und erfolgreichen Exkursionen danke ich Gerhard Lang (Universität Würzburg), Dr. Rüdiger Stöhr und Dr. Vanessa Grabowski (IFM, Kiel) und Dr. Jan Hiort (Universität Düsseldorf).

Bei Frau Dr. Angela Günther und ihren Mitarbeitern, möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeiten in ihrem Labor und die Hinweise zu den enzymhistochemischen Untersuchungen bedanken

Für hilfreiche Anregungen zur Erstellung der Dissertationsschrift danke ich herzlich Dr. Corinna Dubischar, Dr. Frank Poppe, Dr. Henning Schünke und Dr. Elisabeth Helmke.

Den Mitgliedern des Institutes für Meereswissenschaften „Hydra“ in Fetovaia auf Elba danke ich für ihre gute Feldarbeit und Unterstützung der Probenbearbeitung in ihrer Station.

Christian Wild (Max-Planck-Institut, Bremen) danke ich für die Probenbeschaffung von der Insel Giglio.

Dr. Ann Andersen sei für ihre Hilfe bei der Probenbeschaffung durch die Biologische Station Roscoff gedankt und Prof. Dr. Norbert Wilbert für den sicheren Transport der Proben nach Bonn.

Prof. Dr. Rob W. M. van Soest (Universität Amsterdam) danke ich herzlich für die Nachbestimmung der Schwammproben.

Herrn Prof. Dr. Harald Engelhard (MPI, Martinsried) und Herrn Dr. Heinz Schlesner (Universität Kiel) danke ich herzlich für ihre Einschätzung der elektronenmikroskopischen Ergebnisse.

Frau Prof. Dr. Margherita Sciscioli (Universität Bari) danke ich für ihre Hinweise zu den Schwammoocyten.

Dr. Gregor Kirfel (Universität Bonn) danke ich für die Diskussionsbereitschaft zu verschiedenen zellbiologischen Fragen.

Für die finanzielle Förderung im Rahmen des Projektes „Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen" (03F0239A) gilt mein Dank der Zentaris AG und dem BMBF.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Frau Elisabeth für ihre ständige Unterstützung und ihr Verständnis für die Arbeit und Benedict, Jonathan und Sophia für die Freude, die sie mir täglich schenken.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln, die Dissertation persönlich, selbständig und ohne unerlaubte Hilfen angefertigt habe. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des Weiteren erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Aachen,