

Matthias Voigt

Biotechnologische Methoden zur Kultivierung von Schwämmen

**Grundlegende Untersuchungen
zur ex-situ Kultivierung mariner Porifera**



universitätsverlag karlsruhe

Matthias Voigt

Biotechnologische Methoden zur Kultivierung von Schwämmen

Grundlegende Untersuchungen zur ex-situ Kultivierung mariner Porifera

Titelbild mit freundlicher Genehmigung von
Dr. A. Jaklin, Meeresbiologisches Institut „Ruđer Bošković“, Rovinj, Kroatien.

Biotechnologische Methoden zur Kultivierung von Schwämmen

**Grundlegende Untersuchungen zur ex-situ Kultivierung
mariner Porifera**

von
Matthias Voigt



universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)
Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2009

Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe
c/o Universitätsbibliothek
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz
lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2009
Print on Demand

ISBN: 978-3-86644-292-4

Biotechnologische Methoden zur Kultivierung von Schwämmen

Grundlegende Untersuchungen zur *ex-situ* Kultivierung mariner Porifera

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik der
Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl. - Biol. Matthias Voigt
aus Halle/Saale

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Koreferent: Prof. Dr. - Ing. Clemens Posten

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	XIII
Summary.....	XVII
1. Einleitung	1
Fragestellungen und Ziele	3
2. Grundlagen	4
2.1. Marine Naturstoffe	4
2.2. Biologie der Schwämme	7
Einteilung und Vorkommen.....	7
Verbreitung.....	7
Morphologie.....	8
Anatomie und Physiologie.....	8
Ernährung.....	10
Assoziierte Mikroorganismen.....	11
Vermehrung.....	12
2.3. Theoretische Grundlagen	13
2.3.1 Methodische Ansätze.....	13
2.3.2 Schwammfragmente.....	15
2.3.2.1 Einfluss verschiedener Faktoren auf Schwammfragmente.....	15
Wassertemperatur.....	15
Fragmentgröße.....	17
Licht.....	18
2.3.2.2 Ernährung von Schwammfragmenten.....	19
Partikuläre Nahrung.....	19
Gelöste Substanzen.....	20
2.3.3 Multizelluläre Reaggregate.....	22
2.3.3.1 Ernährung multizellulärer Reaggregate mit gelösten Substanzen.....	24

2.3.4	Gemmulae.....	25
2.3.4.1	Auskeimversuche mit <i>S. domuncula</i> - Gemmulae.....	27
	Einfluss der Temperatur auf die Auskeimung.....	28
	Einfluss von Licht auf die Auskeimung.....	30
2.3.5	Immobilisierung von Schwammzellen.....	31
2.3.5.1	Grundlagen der Immobilisierung.....	31
	Vollkugeln.....	31
	Hohlkugeln.....	32
2.3.5.2	Immobilisierung von Schwammzellen in Natrium-Alginat und Cellulosesulfat.....	32
2.3.5.3	Proliferationsnachweis (BrdU-Assay).....	34
2.3.5.4	Identitätsnachweis.....	35
2.4	Methoden zur Wachstums- und Biomassenbestimmung von Schwämmen.....	36
3.	Material und Methoden.....	37
3.1	Material.....	37
3.1.1	Probengebiet.....	37
3.1.1.1	Transport der Schwämme.....	37
3.1.2	Technischer Aufbau der Kultivierungsbecken.....	38
3.1.3	Modellorganismen.....	41
3.1.3.1	<i>Aplysina aerophoba</i>	42
3.1.3.2	<i>Axinella polypoides</i>	43
3.1.3.3	<i>Suberites domuncula</i>	44
3.1.3.4	<i>Suberites massa</i>	45
3.2	Methoden.....	46
3.2.1	Schwammfragmente.....	46
3.2.1.1	Herstellung von Schwammfragmentträgern.....	46
3.2.1.2	Kultivierungsmodule.....	47
3.2.1.3	Photographische Dokumentation.....	48
3.2.1.4	Screening nach geeigneten Arten für Fragmentierungsversuche.....	49
3.2.1.5	Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von Wassertemperatur und partikulärer Nahrung.....	49

3.2.1.6	Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit der Initialgröße.....	50
3.2.1.7	Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in natürlichem Meerwasser.....	51
3.2.1.8	Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in künstlichem Meerwasser.....	52
3.2.1.9	Einfluss von Extrakten aus marinen Tieren auf das Wachstum von Schwammfragmenten.....	53
	RPMI - Kulturmedium.....	53
	Herstellung des Tintenfisch-Extraktes.....	53
3.2.1.10	Ernährung von Schwammfragmenten mit einem Komplexmedium.....	54
3.2.1.11	Wachstum von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen.....	55
3.2.2	Multizelluläre Reaggregate.....	57
3.2.2.1	Herstellung der multizellulären Reaggregate.....	57
3.2.2.2	Ernährung der multizellulären Reaggregate mit gelösten Substanzen...	58
3.2.3	Gemmulae.....	59
3.2.3.1	Auskeimversuche mit <i>S. domuncula</i> - Gemmulae.....	59
3.2.3.2	Auskeimung von Gemmulae in Abhängigkeit von der Wassertemperatur.....	60
3.2.3.3	Ernährung von Gemmulae und Jungschwämmen mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen.....	61
3.2.3.4	Einfluss von Licht auf die Auskeimung von Gemmulae.....	61
3.2.3.5	Auskeimung von Gemmulae und Ernährung von Jungschwämmen in 24-Loch-Platten.....	62
	Versuch 1.....	62
	Versuch 2.....	63
3.2.4	Immobilisierung von Schwammzellen.....	64
	Herstellung einer Schwammzell-Suspension.....	64
	Tropflösungen für die Immobilisierung.....	64
3.2.4.1	Proliferationsnachweis (BrdU-Assay).....	65
3.2.4.2	Detektion der mit BrdU markierten DNA.....	66
3.2.4.3	Identitätsnachweis.....	67

3.2.4.4	DNA - Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion.....	68
	Primer <i>Suberites domuncula</i>	69
	Primer <i>Axinella polypoides</i>	69
	PCR - Ansatz.....	70
	PCR - Ablaufschema.....	70
3.2.4.5	Gel-Elektrophorese.....	71
4.	Ergebnisse	73
4.1	Schwammfragmente	73
4.1.1	Screening nach geeigneten Arten für Fragmentierungsversuche.....	73
4.1.2	Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von Wassertemperatur und Ernährung.....	75
4.1.3	Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von der Initialgröße der Fragmente.....	80
4.1.4	Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in natürlichem Meer- wasser.....	83
4.1.5	Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in künstlichem Meer- wasser.....	88
4.1.6	Einfluss von Extrakten aus marinen Tieren auf das Wachstum von Schwammfragmenten.....	88
4.1.7	Ernährung von Schwammfragmenten mit einem Komplex- medium.....	93
4.1.7.1	Ernährung von <i>S. massa</i> -Fragmenten mit einem Komplexmedium.....	96
4.1.8	Wachstum von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von der Ernährung mit gelöster und partikulärer Nahrung.....	100
4.2	Multizelluläre Reaggregate	102
4.2.1	Screening nach geeigneten Schwammarten zur Herstellung von multizellulären Reaggregaten.....	102
4.2.2	Ernährung der multizellulären Reaggregate mit gelösten Substanzen und partikulärer Nahrung.....	105
4.3	Gemmulae	107
4.3.1	Auskeimversuche mit <i>S. domuncula</i> -Gemmulae.....	107
4.3.2	Auskeimung von Gemmulae in Abhängigkeit von der Wassertem- peratur.....	109

4.3.3	Ernährung von Gemmulae und Jungschwämmen mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen.....	111
4.3.4	Einfluss von Licht auf die Auskeimung von Gemmulae.....	112
4.3.5	Auskeimversuche mit Gemmulae in 24-Loch-Platten.....	113
	Versuch 1.....	113
	Versuch 2.....	114
4.4	Immobilisierung von Schwammzellen.....	116
4.4.1	Screening nach geeigneten Schwammarten zur Immobilisierung.....	116
4.4.2	Proliferationsnachweis (BrdU-Assay) - Detektion der mit BrdU markierten DNA.....	117
4.4.3	Identitätsnachweis.....	119
5.	Schlußbetrachtungen	122
5.1	Faktoren, welche die <i>ex-situ</i> Kultivierung von Schwämmen beeinflussen.....	122
5.2	Schwammfragmente.....	124
5.3	Multizelluläre Reaggregate.....	128
5.4	Gemmulae.....	131
5.5	Immobilisierung von Schwammzellen.....	134
5.6	Résumé.....	136
5.7	Ausblick.....	138
6.	Formeln	139
7.	Literaturverzeichnis	140
7.1	Referenzen.....	140
7.2	Internetseiten.....	157
8.	Danksagung	159
9.	Appendix	162

Abkürzungsverzeichnis

Aa	Schwammart <i>Aplysina aerophoba</i>
Abb.	Abbildung
A. dest	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Ap	Schwammart <i>Axinella polypoides</i>
ASW	künstliches Meerwasser (stellenweise sterilfiltriert)
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CMFSW	Kalzium-Magnesium-Freies Seewasser
CS	Cellulosesulfat
Cn	Schwammart <i>Chondrilla nucula</i>
Cr	Schwammart <i>Chondrosia reniformes</i>
Cy3	Carbocyanin 3, Farbstoff zur Zellfärbung
Cy5	Carbocyanin 5, Farbstoff zur Zellfärbung
DAPI	4', 6-Diamin-2-phenolindol, Farbstoff zur Zellfärbung
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DES	DNase und Pyrogenfreies Wasser
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium, Nährmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	engl.: Dissolved organic carbon - gelöster organischer Kohlenstoff
engl.	englisch
et al.	`et altera`: und weitere
etc.	`et cetera`: und so weiter
E	Einstein
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>ex-situ</i>	im künstlichen Habitat
FG	Feuchtgewicht (Biomasse)
FisH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Hel 01	Bakterienstamm <i>Janibacter limosus</i>
Hel 04	Bakterienstamm <i>Halomonas variabilis</i>
<i>in-vivo</i>	in lebendem Zustand
<i>in-vitro</i>	im Reagenzglas, im Labor
<i>in-situ</i>	im natürlichen Habitat
KA	Kalzium - Alginat
Lsg.	Lösung
max.	maximal
min.	minimal
Mio.	Million(en)
MO(`s)	Mikroorganismus, ~organismen
MZRA	Multizellreaggregate
N	Anzahl
NA	Natrium - Alginat
n. det.	nicht bestimmt
OD (xxx)	Optische Dicht bei Wellenlänge xxx nm

PBS	engl.: Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDADMAC	Polydiallyl - Dimethyl - Ammoniumchlorid
PFA	Paraformaldehyd
Pf	Schwammart <i>Petrosia ficiformis</i>
Phaeo	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
PHA	Phytohemaagglutinin
POC	engl.: Particular organic carbon - partikulärer organischer Kohlenstoff
POM	engl.: Particular organic material - partikuläres organisches Material
PPS	engl. Protein precipitating solution - Protein -Komplex(bildende)-Lösung
PUFA	engl.: poly unsaturated fatty acid - mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RMW	Rovinj - Meerwasser (sterilfiltriert)
RPMI	verwendetes Futtermedium, RPMI - 1640, im Versuch 3.2.1.9
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute
SB89	Bakterienstamm
SB177	Bakterienstamm (<i>Vibrio</i> sp.)
SEWS	engl.: Salt ethanol wash solution, Salz - Ethanol - Waschlösung
Sd	Schwammart <i>Suberites domuncula</i>
SMW	Sigma - Meerwasser
Sm	Schwammart <i>Suberites massa</i>
s. o.	siehe oben
sp.	Epitheton einer unbestimmten Spezies
s. u.	siehe unten
Syn	<i>Synechococcus</i> sp.
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-hydroxymethylaminomethan-Acetat
TOC	engl.: Total organic carbon - Gesamtkohlenstoffgehalt TOC= DOC+POC
VE	vollentsalztes Wasser
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
~	ungefähr, rund
<, <<	kleiner als..., viel kleiner als...
>, >>	größer als..., viel größer als...
±	Plus / Minus, Toleranzbereich
Σ	Summe

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

GRUNDLAGEN

Abbildung G 1	Strukturformeln der bioaktiven Substanzen Avarol (links) und Halichondrin B (rechts), die aus den marinen Schwammarten <i>Dysidea avara</i> (MINALE <i>et al.</i> 1974) bzw. <i>Halichondria okadai</i> (HIRATA & UEMURA 1986) und <i>Lissodendoryx</i> sp. (LITAUDON <i>et al.</i> 1994) extrahiert wurden.	5
Abbildung G 2	Aufteilung der im Jahr 2004 neu entdeckten und beschriebenen bioaktiven Substanzen extrahiert aus marinen Organismen nach Phylum (links) und Wirkung (rechts). Für ein besseres Verständnis wurden die Wirkungen der isolierten bioaktiven Substanzen in acht, hauptsächlich Krankheitsbezogene Gruppen eingeteilt. Die Gruppe „Verschiedene“ umfasst dabei neurologische, Blutdruck-, Fruchtbarkeits-, Allergiebasierende- und Enzymaktivitäts-Assays, die Gruppe „Methodologisch“ umfasst Bioassaymethoden, Aktionsmechanismen, Strukturaktivitätsstudien, Radioimmunoassays und andere Assays (nach BLUNT <i>et al.</i> 2004, 2006, verändert).....	6
Abbildung G 3	Schematischer Aufbau eines Schwammes. Gezeigt werden die einzelnen Schichten des Schwammkörpers (nach: AX 1996, verändert).	9
Abbildung G 4	Schematischer Bauplan der einzelnen Organisationsstufen: A - Ascontyp, B - Sycontyp, C - Sycontyp mit Cortex und D - Leucontyp (nach: GRUNER 1993, verändert). Das Choanocytenepithel ist durch verstärkte Linien hervorgehoben. Der Wasserausstrom bzw. die Strömungsrichtung durch das Osculum ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.....	10
Abbildung G 5	Spezifische Wachstumsraten von <i>Ephydatia fluviatilis</i> bei fünf verschiedenen Temperaturen. (nach: HARSHA <i>et al.</i> 1983, verändert).....	16
Abbildung G 6	Darstellung des Zusammenhangs der Partikelkonzentration im Wasser und der Partikelfiltrationsrate von <i>Pseudosuberites andrewsii</i> für die Futterorganismen (A) <i>Dunaliella tertiolecta</i> und (B) <i>Synechococcus</i> sp. (nach: OSINGA <i>et al.</i> 2001, verändert).....	20
Abbildung G 7	Schematischer Aufbau von Gemmulae (nach: HERLANT-MEWIS 1948, verändert).....	26
Abbildung G 8	Schema eines aus Gemmulae gekeimten Jungschwammes, gewachsen unter Deckglas (Gemmulae unter Deckglas unten im Bild, Jungschwamm im Querschnitt vergrößert dargestellt, Nahrungspartikel werden in den angedeuteten Choanocytenkammern aus dem Wasser filtriert. Pfeile geben die Strömungsrichtung des Wassers durch das aquifere System des Schwamms ins Atrium und Osculum an. (nach: ANKEL & EIGENBRODT 1950, verändert).....	27
Abbildung G 9	Auskeimrate von <i>Spongilla fragilis</i> in Abhängigkeit von der Wassertemperatur. (nach: STREKAL & MCDIFFETT, 1974, verändert).....	28
Abbildung G 10	Auskeimrate von Gemmulae in Abhängigkeit von der Dauer des Kälteimpulses. (nach: FELL 1995, verändert).....	29
Abbildung G 11	Sterberate von <i>S. domuncula</i> -Zellen in Abhängigkeit von der Wassertemperatur. (nach: SIPKEMA <i>et al.</i> 2004, verändert).....	29

**MATERIAL
UND
METHODEN**

Abbildung M 1	Geographische Karte der istrischen Halbinsel, mit Lage des Limski-Kanals (roter Kasten) und des Untersuchungsgebiets nahe der Stadt Rovinj, mit Bathymetrie der einzelnen Tauchplätze: Insel San Giovanni - A ₁ , Insel Figarola - A ₂ , Insel Banjole - A ₃ und Limski Kanal L ₅ -L ₃₇ . (nach: MESSAL 2005, verändert).....	38
Abbildung M 2	Schematischer Aufbau von Kultivierungsbecken H, bestehend aus einer modularen Einheit von acht oberen Modulbecken (H ₁ - H ₈) und darunter liegenden, temperatursteuerbaren Versorgungsbecken, einem unterem Filterbecken (mit Kühler, Heizstab, Biofilter, Eiweißabscheider und Ozonisor), Zu- und Abläufen, sowie der Kontroll- und Regeltechnik (Meßelektroden für Temperatur, Salinität, O ₂ -Gehalt und IKS-Aquariencomputer). Über dem Becken wurde ein Tageslichtstrahler installiert, um eine naturähnliche Photoperiode zu simulieren. (nach: HAUSMANN <i>et al.</i> 2006, verändert).....	40
Abbildung M 3	Abb. M 3: Kolonie von <i>Aplysina aerophoba</i> . Gut sichtbar sind die wasserführenden Kanäle, die im Atrium enden, von dem aus das eingestrudelte Wasser durch das Osculum wieder ans umgebende Wasser abgegeben wird.....	42
Abbildung M 4	<i>Axinella polypoides</i> im Vordergrund, flankiert von Steinkorallen, am Tauchplatz L30 („Axinella-Grund“) im Limski-Kanal, Tiefe ca. 12 - 15 m.....	43
Abbildung M 5	Unterschiedliche Phänotypen von <i>S. domuncula</i> , gewachsen auf einem Schneckengehäuse. Der Schwamm ist vergesellschaftet mit einem Einsiedlerkrebs der Gattung <i>Paguristis</i> sp.....	44
Abbildung M 6	<i>Suberites massa</i> auf Schneckengehäuse (im Bild nicht sichtbar), mit Einsiedlerkrebs der Gattung <i>Paguristes</i> sp. vergesellschaftet.....	45
Abbildung M 7	Schwammfragmentträger Typ II (links: Vorderseite des Trägers mit eingeklebtem Millimeterpapier als Maßstab, rechts: Rückseite mit Codierung des Fragments (Sm = Schwammart <i>Suberites massa</i> , 5.4 = Fragmentnummer bzw. Klon, Jul. 2007 = Herstellungszeitpunkt des Fragments).....	46
Abbildung M 8	Kultivierungsmodul mit angeschlossener Pumpe zur permanenten Durchströmung der Fragmentträger. Pfeile geben die Strömungsrichtung des Wassers an.....	47
Abbildung M 9	Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Licht auf das Wachstum von Schwammfragmenten in Becken mit permanentem Meerwasserdurchfluss. Im Bild links ist das abgedunkelte Becken zu sehen (hier noch nicht abgedeckt), in der Bildmitte das beleuchtete Becken, das 10 h am Tag mit einem 250 W Tageslichtstrahler beleuchtet wurde, rechts ein weiteres, nicht zum Versuch gehörendes Becken.....	51
Abbildung M 10	Skizze der Objektglaträger für die Kultivierungsversuche mit Reaggregaten und Gemmulae.....	57
Abbildung M 11	Gemmulae von <i>S. domuncula</i> auf einem Schneckengehäuse (links), sowie in Objektglaträger eingesetzte Gemmulae (rechts). Im Hintergrund ist das in den Objektglaträger eingeklebte Millimeterpapier als Referenz-Maßstab zu erkennen.....	59
Abbildung M 12	Schematische Angabe der verwendeten Zellzahlen von <i>Synechococcus</i> sp. zur Ernährung von Jungschwämmen in einer 24-Loch-Platte.....	62
Abbildung M 13	Schematische Darstellung des Vertropfens einer Matrix-Schwammzellen-Suspension mit Hilfe einer Spritze und Kanüle in ein Fällbad zur Immobilisierung. Links: Natrium-Alginat (NA) + Zellsuspension wird in 0,5 M CaCl ₂ + 1 ml Triton 100 [®] vertropft. Rechts: CS + Zellsuspension wird in ein Fällbad aus PDADMAC in ASW + 1 ml Triton 100 [®] vertropft (nach: FABER 2004, verändert).....	65
Abbildung M 14	Schema des PCR-Thermocyclerprogrammes zur Amplifikation der DNA-Fragmente von <i>S. domuncula</i> . Angegeben sind Zyklusanzahl, Temperatur und die zugehörige Dauer jedes Temperatur-Schrittes des Programms.....	71
Abbildung M 15	Schema des Touchdown-PCR-Thermocyclerprogrammes zur Amplifikation der DNA-Fragmente von <i>A. polypoides</i> . Angegeben sind Zyklusanzahl, Temperatur und die zugehörige Dauer jedes Temperatur-Schrittes des Programms.....	71

Tabelle M 1	Anzahl eingesetzter Fragmente je Schwammart in die Kultivierungsmodule A - D ($N_{\text{gesamt}} = 102$).....	50
Tabelle M 2	In Modulbecken $H_1 - H_7$ zudosierte, gelöste Substanzen bzw. partikuläre Futterorganismen. Angegeben sind die Zielwerte der zudosierten Substanzen bzw. Futterorganismen im Beckenwasser (ASW).....	56
Tabelle M 3	Anzahl der in Objektglsträger eingesetzten und bei unterschiedlichen Wassertemperaturen inkubierten Gemmulae in Kleinaquarium G_1, G_2 und H_8	60
Tabelle M 4	Anzahl der in Objektglsträger eingesetzten und mit gelösten Substanzen und partikulären Futterorganismen ernährten Gemmulae in Modulbecken $H_1 - H_8$	61
Tabelle M 5	PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der aus Immobilisaten extrahierten DNA. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit Konzentration und entsprechendem Volumen [μl].....	70

ERGEBNISSE

Abbildung E 1	<i>S. domuncula</i> -Fragment Sd 5/03 (hergestellt am 21.09.2005), zu Beginn des Versuchs (links) und nach 5 Wochen in Kultivierung (rechts).....	74
Abbildung E 2a	Prozentualer Anteil der vitalen Schwammfragmente über die Dauer des Versuchs (~ 130 Tage) in Kultivierungsbecken A und B, bei 25 °C Wassertemperatur und zudosierter partikulärer Nahrung. Anzahl eingesetzte Fragmente: <i>C. nucula</i> = 5, <i>C. reniformes</i> = 6, <i>S. domuncula</i> = 6, <i>A. aerophoba</i> = 6, <i>A. polypoides</i> = 3.....	77
Abbildung E 2b	Prozentualer Anteil der vitalen Schwammfragmente über die Dauer des Versuchs (~ 130 Tage) in Kultivierungsbecken C, bei 20 °C Wassertemperatur und zudosierter partikulärer Nahrung. Anzahl eingesetzte Fragmente: <i>C. nucula</i> = 5, <i>C. reniformes</i> = 5, <i>S. domuncula</i> = 6, <i>A. aerophoba</i> = 5, <i>A. polypoides</i> = 3.....	78
Abbildung E 2c	Prozentualer Anteil der vitalen Schwammfragmente über die Dauer des Versuchs (~ 130 Tage) in Kultivierungsbecken D, bei 18 - 20 °C Wassertemperatur, ohne das partikuläre Nahrung zudosiert wurde. Anzahl eingesetzte Fragmente: <i>C. nucula</i> = 5, <i>C. reniformes</i> = 5, <i>S. domuncula</i> = 8, <i>A. aerophoba</i> = 5, <i>A. polypoides</i> = 3.....	78
Abbildung E 3	<i>S. domuncula</i> -Fragmente zeigen nach ~ 18 Wochen in Kultivierung eine deutliche Reduktion der Fragmentdicke (Abflachen).....	79
Abbildung E 4a	Prozentualer Anteil vitaler <i>S. domuncula</i> -Fragmente, abhängig vom Trägertyp in den die Fragmente eingesetzt wurden, über die Kultivierungsdauer (~ 140 Tage) bei 18 °C Wassertemperatur, ohne zudosierte Nahrung. Anzahl eingesetzte Schwammfragmente je Trägertyp, $N = 13$	81
Abbildung E 4b	Prozentualer Anteil vitaler <i>A. aerophoba</i> -Fragmente, abhängig vom Trägertyp in den die Fragmente eingesetzt wurden, über die Kultivierungsdauer (~ 140 Tage) bei 18 °C Wassertemperatur, ohne zudosierte Nahrung. Anzahl eingesetzte Schwammfragmente je Trägertyp, $N = 13$	82
Abbildung E 5	Aufnahmen der Kultivierungsbecken in Rovinj, Kroatien, um den Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in natürlichem Meerwasser zu bestimmen, zum Ende des Versuchs. Im linken Bild (beleuchtetes Becken) ist ein massives Algenwachstum zu erkennen, welches das Kultivierungsmodul mit den darin befindlichen Fragmenten vollständig vom Licht abschirmte. Im Bild des abgedunkelten Kultivierungsbeckens (rechts, nach manuellem Entfernen der Algen) ist das Herauswachsen der <i>A. aerophoba</i> -Fragmente und Buds durch Gewebeumstrukturierung und Formveränderung, die an der Aussenkante der Fragmentträger abgeschnürt werden, aus den Fragmentträgern zu erkennen.....	84
Abbildung E 6	Vergleich der Flächenänderungen der Schwammfragmente von <i>A. aerophoba</i> , <i>S. domuncula</i> und <i>Tethya</i> sp. im beleuchteten und im abgedunkelten Kultivierungsbecken, in natürlichem Meerwasser, zu Beginn und zum Ende des Versuchs (nach 252 Tagen). Anzahl Fragmente je Becken: beleuchtetes Becken <i>A. aerophoba</i> (Aa) = 8, <i>S. domuncula</i> (Sd) = 9, <i>Tethya</i> sp. = 3; abgedunkeltes Becken Aa = 9, Sd = 8, <i>Tethya</i> sp. = 3.....	85

Abbildung E 7	Morphologische Veränderungen, Gewebeumstrukturierung und Flächenveränderung, exemplarisch dargestellt am Beispiel der Fragmente Aa 15_1 (obere Reihe), Sd 6_01 (mittlere Reihe) und Tethya 4_01 (untere Reihe) kultiviert im abgedunkelten Becken. Die Fotos A, C und E wurden zu Versuchsbeginn, und B, D und F bei Versuchsende, nach 252 Tagen aufgenommen. In Foto B ist das vom Schwammfragment gebildete Osculum zu sehen (Pfeil) und in Foto C das verbliebene <i>S. domuncula</i> -Fragment zu Versuchsende (Pfeil).....	86
Abbildung E 8	Veränderung der Fläche der <i>A. polypoides</i> -Fragmente in den verschiedenen Kulturmedien über die Kultivierungsdauer (140 Tage). Anzahl eingesetzte Schwammfragmente je Medium, N = 3.....	89
Abbildung E 9	Veränderung der Fläche der <i>S. domuncula</i> -Fragmente in den verschiedenen Kulturmedien über die Kultivierungsdauer (140 Tage). Anzahl eingesetzter Schwammfragmente je Medium, N = 3.....	90
Abbildung E 10	Veränderung der Fläche der <i>S. massa</i> -Fragmente in den verschiedenen Kulturmedien über die Kultivierungsdauer (140 Tage). Anzahl eingesetzter Schwammfragmente je Medium, N = 3.....	91
Abbildung E 11a	Flächenveränderung der mit Krebsfutter und Ethanol gefütterten <i>A. polypoides</i> -, <i>S. domuncula</i> - und <i>S. massa</i> -Fragmente, in Kultivierungsbecken I, über die Dauer der Kultivierung (140 Tage). Anzahl eingesetzte Fragmente je Schwammart: <i>A. polypoides</i> = 4, <i>S. domuncula</i> = 3, <i>S. massa</i> = 3.....	93
Abbildung E 11b	Flächenveränderung der <i>A. polypoides</i> -, <i>S. domuncula</i> - und <i>S. massa</i> -Fragmente, in Kultivierungsbecken J ohne zusätzliche Fütterung (Kontrolle), über die Dauer der Kultivierung (140 Tage). Anzahl eingesetzte Fragmente je Schwammart: <i>A. polypoides</i> = 4, <i>S. domuncula</i> = 3, <i>S. massa</i> = 3.....	94
Abbildung E 12a	Veränderung der Fläche der <i>S. massa</i> -Fragmente in Kultivierungsbecken I (gefüttert mit Krebsfutter und Ethanol) und in Kultivierungsbecken J (Kontrolle, ohne Fütterung)....	97
Abbildung E 12b	Veränderung der Fläche der mit Krebsfutter und Ethanol gefütterten <i>S. massa</i> -Fragmente, in Becken I (am Beispiel von Fragment Sm 3, Reihe A-E) und der ungefütterten Fragmente, in Becken J (am Beispiel von Sm 2_01, Reihe a-e). Im Bildhintergrund zu sehen, dass in die Fragmentträger eingeklebte Millimeterpapier, als Maßstab.....	97
Abbildung E 13	Fotos der mit partikulärem Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol ernährten <i>S. massa</i> -Fragmente in Kultivierungsbecken I, nach 336 Tagen Kultivierung. Fragment Sm 1 (oben links), Sm 2 (oben rechts), Sm 3 (unten links), Sm 4 (unten rechts). Durch Pfeile gekennzeichnet sind die Oscula, welche die Fragmente ausgebildet haben. Im Gewebe der Fragmente sichtbar, sind die Kanäle des ausgebildeten aquiferen Systems.....	98
Abbildung E 14	Spezifische Wachstumsraten der mit partikulärem Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol ernährten <i>S. massa</i> -Fragmente, in Kultivierungsbecken I und der ungefütterten Fragmente, in Kultivierungsbecken J (Kontrolle), über die Versuchsdauer (399 bzw. 312 Tage).....	99
Abbildung E 15	Multizelluläre Reaggregate (A) aus <i>S. domuncula</i> -zellen, ca. 6 h nach Gewebe-Dissoziation und Reaggregation der Zellen, Vergrößerung: 40x, (B) verklumpte <i>S. domuncula</i> -MZRA nach 4 - 5 Tagen Inkubation in einer Petrischale, Vergrößerung: 10x, (C) <i>A. polypoides</i> -MZRA, direkt nach dem Einsetzen in einen Objektglaträger, Vergrößerung 100x und (D) nach 4 Wochen in Kultivierung. Länge Maßstabbalken: 1 cm.....	104
Abbildung E 16	(A) Agglomeration von ca. 12 <i>S. domuncula</i> -Gemmulae nach dem Einsetzen in einen Objektglaträger, Entwicklungsstadium 1. (B) Auskeimende Gemmulae und Bildung eines Jungschwammes nach 3 Wochen in Kultivierung. Zu erkennen ist ein planares Ausbreiten von Zellen, das zum Festhaften am Substrat dient (links im Bild), die beginnende Ausbildung des aquiferen Systems im Gewebe und die Bildung eines Osculums (Pfeil). Die auskeimenden Gemmulae erreichten damit Stadium 4. (C) Aus Gemmulae gekeimtes Jungschwammgewebe, nach 10 Wochen in Kultivierung, entspricht Entwicklungsstadium 5. Gut zu erkennen ist die fortgeschrittene Organisation des aquiferen Systems im Schwammgewebe und die Abgrenzung des Jungschwammes nach außen, durch die Bildung eines Pinacoderms (Pfeil). Vergrößerung für Bild A und B: 40x, für Bild C: 100x.....	108
Abbildung E 17	Auskeimungsrate von <i>S. domuncula</i> -Gemmulae in Abhängigkeit von der Wassertemperatur, bei der die Gemmulae inkubiert wurden.....	110

Abbildung E 18	<i>A. polyoides</i> -Immobilisate (links) und von <i>S. domuncula</i> (rechts), jeweils in Kalzium-Alginat, in ASW.....	117
Abbildung E 19	(A) <i>S. domuncula</i> -Gewebefragment in der Randzone einer Immobilisat-Kugel (in schwarz), nach 24 h Inkubation in 10 µM BrdU-Lösung, (B) immobilisierte <i>S. domuncula</i> -Zellen in der Randzone einer KA-Immobilisat-Kugel (400x vergrößert), BrdU-positive Zellkerne leuchten deutlich heller gegenüber dem Gewebe auf (Pfeil).	118
Abbildung E 20	Agarose-Gel der aufgetragenen PCR-Produkte, extrahiert aus <i>S. domuncula</i> -Immobilisaten, die mit Primersystem Sub 2F - SPO_SO1R amplifiziert wurden. I. Spur: leer, II. Spur: 1 kBp DNA-Größenmarkierungs-Leiter, III. Spur: DNA aus frischem, immobilisiertem Schwammgewebe, IV. Spur: in KA, lebendig, V. Spur: in KA, tot (durch 10 minütige Hitzeeinwirkung bei ~ 80 °C abgetötet), VI. Spur: in CS, lebendig (die DNA der Proben in der IV. - VI. Spur wurden direkt nach der Immobilisierung extrahiert), VII. Spur: in KA, lebendig, VIII. Spur: in CS, lebendig, IX. Spur: in KA, tot (die DNA der Proben in der VII. - IX. Spur wurden eine Woche nach der Immobilisierung extrahiert), X. Spur: in KA, lebendig, XI. Spur: in CS, lebendig, XII. Spur: in KA, tot (die DNA der Proben in der X. - XII. Spur wurden zwei Wochen nach Immobilisierung extrahiert), XIII. Spur: in KA, tot (die DNA wurde drei Wochen nach der Immobilisierung extrahiert), XIV. Spur: Kontrolle (gleicher PCR-Ansatz wie für Spur III-XIII, aber mit PCR-Wasser statt DNA-Probe), XV. Spur: Positivprobe.....	119
Abbildung E 21	Agarose-Gel der aufgetragenen PCR-Produkte, extrahiert aus <i>A. polyoides</i> -Immobilisaten, die mit Primersystemen AXN PO3F - SPO_SO1R (Spur 3 - 6) bzw. AXN PO4F - SPO_SO1R (Spur 7 - 10) amplifiziert wurden. 1. Spur: leer, 2. Spur: 1 kBp DNA-Größenmarkierungs-Leiter, 3. Spur: DNA aus frischem, nicht immobilisiertem Schwammgewebe, 4. Spur: in KA, 5. Spur: in CS, 6. Spur: Kontrolle (gleicher PCR-Ansatz wie für Spur 3-9, aber mit PCR-Wasser statt DNA-Probe), 7. Spur: frisches, nicht immobilisiertes Schwammgewebe, 8. Spur: in KA, 9. Spur: in CS, 10. Spur: Kontrolle. Die DNA-Proben in Spur 4, 5, 8 und 9 wurden direkt nach der Immobilisierung extrahiert.....	121
Tabelle E 1	Überblick über die getesteten Schwammarten auf ihre Eignung für Fragmentierungsversuche. ++ = sehr gut geeignet, + = gut geeignet, - = nicht geeignet.....	73
Tabelle E 2	Gemessene Zellzahlen [Zellzahl ml ⁻¹] in den einzelnen Modulbecken, in die <i>Synechococcus</i> sp. und verschiedene, gelöste Substanzen zudosiert wurden.....	101
Tabelle E 3	Überblick über die getesteten Schwammarten auf ihre Eignung für die Herstellung von Reaggregaten. ++ = sehr gut geeignet, + = gut geeignet, - = nicht geeignet.....	102
Tabelle E 4	Überblick über die getesteten Schwammarten auf ihre Eignung für die Herstellung von Immobilisaten. ++ = sehr gut geeignet, - = nicht geeignet, n. det. = nicht untersucht..	116
APPENDIX		
Tabelle A 1a	Überblick über die Zusammensetzung der Nährmedien für die Kultivierung der Futterorganismen.....	162
Tabelle A 2	Verwendete Chemikalien, um den Silikatgehalt (angesetzt als Natronwasserglaslösung in ASW), in der Lösung zu bestimmen, die für die Kultivierung von Fragmenten, Reaggregaten und Gemmulae als Si-Quelle eingesetzt wurde.....	164
Tabelle A 3	Überblick über die Chemikalien und Aminosäuren mit denen das RPMI-1640 Medium angereichert und damit für die Kultivierung von Schwämmen angepasst wurde.....	165
Tabelle A 4	Verwendete Medien und Materialien für den 24-Loch-Platten - Versuch 1 und 2.....	166
Tabelle A 5a	Überblick über die für den BrdU-Assay verwendeten Chemikalien und Antikörper, Hersteller, Spezifikationen und Produktnummer	167
Tabelle A 5b	Eingewogene Chemikalien zur Herstellung der PBS-Lösung	167
Tabelle A 6	Benötigte Chemikalien für die Herstellung von „Hauptkleber“, zum Beschichten von Objektträgern	168

Zusammenfassung

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung neuer Methoden und die Optimierung bereits angewendeter Methoden für eine dauerhafte und nachhaltige *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen als Lieferanten von pharmakologisch interessanten Naturstoffen. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Kultivierungsparameter (z.B. Wassertemperatur, Beleuchtung, Ernährung) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Vitalität und das Wachstum der Schwämme analysiert. Die Untersuchungen wurden an Individuen verschiedener mediterraner Schwammarten, die aus ihrem natürlichen Habitat entnommen worden waren, durchgeführt. Insgesamt wurden vier verschiedene Methoden der *ex-situ* Kultivierung getestet: die Kultivierung von Schwammfragmenten, als auch von multi-zellulären Reaggregaten aus dissoziierten Schwammzellen (MZRA), die Auskeimung von Gemmulae und die Immobilisierung von dissoziierten Schwammzellen. Für die Kultivierung wurden spezielle Kultivierungsträger entwickelt, in welche die Schwammfragmente, MZRA und Gemmulae eingesetzt wurden, um ein nahezu „zweidimensionales“ Wachstum zu erzwingen. Die Bestimmung der Vitalität, des Wachstums und der Biomasse der Fragmente, MZRA und Gemmulae konnte dadurch mit Hilfe einer Determinierung der Projektionsfläche anhand von Fotos erfolgen. Diese Methode ist einfach, kostengünstig und verlässlich und beeinträchtigt das Überleben der untersuchten Schwämme nicht.

In einem Screening wurden für die Kultivierung von Schwammfragmenten geeignete Arten bestimmt, mit denen der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die Fragmente untersucht wurde. In Abhängigkeit der ökologischen Bedürfnisse der verwendeten Schwammarten, zeigten sich dabei große Unterschiede. Von den untersuchten Faktoren hatte die Wassertemperatur den stärksten Einfluss auf die Vitalität der Schwammfragmente. Je näher die Wassertemperatur in den Kultivierungsbecken an den Bedingungen im natürlichen Habitat lag, desto größer war die Wahrscheinlichkeit, dass die Fragmente überlebten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass offensichtlich jede Schwammart einen eng begrenzten physiologischen Toleranzbereich gegenüber der Wassertemperatur besitzt, so dass die Ergebnisse hinsichtlich des optimalen Temperaturbereichs einer Kultivierung nicht universell von einer Art auf andere Schwammarten übertragen werden können. Bei der Untersuchung des Faktors Licht konnte festgestellt werden, dass auch (semi)-kryptische Schwammarten, z.B. *Suberites domuncula*, auf eine ausreichende Lichteinstrahlung angewiesen sind, um zu überleben. Bei einer massiven Einschränkung der Beleuchtung und bei Abdunkelung reduzierten die Fragmente von *S. domuncula* und *Aplysina aerophoba* ihre Fläche sehr stark oder starben ab.

Weiterhin konnte ein Einfluss der Initialgröße der Fragmente auf deren Überlebensrate festgestellt werden. Je geringer das Volumen eines verwendeten Schwammfragments war, desto weniger kortikales Gewebe und aquiferes System waren vorhanden, so dass die Reorganisationsfähigkeit des Fragments und die Nahrungs- und Sauerstoffaufnahme aus dem umgebenden Wasser eingeschränkt waren. Dadurch kam es vermutlich zu Nahrungs- und Sauerstofflimitation, welche Hungerbedingungen und Anoxie verursachten, so dass die meisten Fragmente nach kurzer Zeit abstarben. Es konnte festgestellt werden, dass der für das Überleben essentielle minimale Anteil des kortikalen Gewebes am Gesamtvolumen eines Fragments ca. ein Drittel beträgt. Dabei ist vorstellbar, dass dieser minimale Anteil von der jeweils verwendeten Schwammart abhängig ist und bei anderen Arten größer sein müsste, als bei den untersuchten Arten. Die Ernährung stellte sich als ein sehr wichtiger, vielleicht sogar entscheidender Faktor, für eine *ex-situ* Kultur von Schwammfragmenten heraus. In mehreren Untersuchungen wurde getestet, ob sich Fragmente mit partikulären Futterorganismen und gelösten Substanzen ernähren lassen. Die Fragmente konnten die partikuläre Nahrung und die gelösten Substanzen verwerten und starben nicht ab. In den meisten Fällen fehlten jedoch scheinbar für ein nachhaltiges Wachstum der Schwammfragmente essentielle Nahrungsbestandteile, denn nur für die Schwammart *S. massa* konnte, bei gleichzeitiger Verwendung von partikulärem Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol in offener Aquarienkultur, ein Flächenzuwachs von mehr als dreihundert Prozent in einem Jahr erzielt werden. Es blieb allerdings ungeklärt, welche Umstände oder Faktoren für das ausgeprägte Wachstum der Fragmente dieser Art verantwortlich waren.

Durch chemische und mechanische Dissoziation von Schwammgewebe wurden multizelluläre Reaggregate (MZRA) hergestellt. Der Bildungsprozess von MZRA der untersuchten Schwammarten *Axinella polypoides* und *S. domuncula* unterschied sich dabei kaum voneinander. Nach wenigen Tagen hatten sich bei beiden Arten sphäroide MZRA gebildet, die über eine Dauer von vier bis acht Wochen am Leben erhalten werden konnten. Dabei konnte ein Einfluss der Wassertemperatur auf die Bildungsrate und das Überleben der MZRA festgestellt werden. Bei höheren Temperaturen wurden weniger MZRA gebildet bzw. starben die MZRA schneller ab als bei niedrigeren Temperaturen. Außerdem zeigte sich, dass die Bildung von MZRA aus dissoziierten Zellen vom Anteil des kortikalen Gewebes an der dissoziierten Gewebeprobe abhängig war.

Es konnte nicht untersucht werden, ob eine Ernährung der MZRA mit partikulärer Nahrung realisierbar ist, da in den MZRA kein aquiferes System ausgebildet wurde, so dass eine effiziente Nahrungsaufnahme nicht möglich war und die MZRA abstarben.

In den mit Gemmulae durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Gemmulae in Kultivierungsträgern auskeimen und sich zu funktionellen Jungschwämmen entwickeln. Die entstandenen Jungschwämme konnten über eine Dauer von ca. dreieinhalb bis fünf Monaten am Leben erhalten werden. Es wurde gezielt versucht, die Auskeimung durch eine Veränderung der Wassertemperatur oder die Einwirkung von Tieftemperaturimpulsen zum Brechen eines scheinbar präsenten Dormanzzustands zu beeinflussen. Ein zielgerichtetes Auskeimen der Gemmulae konnte aber nicht erreicht werden. Es konnte nicht festgestellt werden, wovon die Auskeimung der Gemmulae beeinflusst wird und ob ein oder mehrere Faktoren für die Auskeimung verantwortlich sind. Versuche, die Jungschwämme mit partikulärer Nahrung oder mit einem Komplexmedium zu ernähren, erbrachten keine positiven Ergebnisse. So lange im Gewebe der auskeimenden Gemmulae und sich formierenden Jungschwämme kein effizientes aquiferes System ausgebildet wurde, konnte vermutlich nur sehr begrenzt Nahrung aufgenommen werden, so dass die Gemmulae nach dem vollständigen Verbrauch der in speziellen Zellen gespeicherten Reservestoffe wieder abstarben.

Zur Immobilisierung von dissoziierten Schwammzellen wurden zwei Matrix-Substanzen (Kalzium-Alginat und Cellulosesulfat) verwendet und es wurde getestet, ob diese Kultivierungsmethode zur Erzeugung kleinstmöglicher lebensfähiger Schwämme und für einen Einsatz in Bioreaktoren geeignet ist. Das Vertropfen der Matrix-Zellsuspensionen in ein entsprechendes Fällbad ergab relativ stabile Kugeln mit einem Durchmesser von ein bis drei Millimeter. Um die Frage zu beantworten, ob die Schwammzellen die Immobilisierung überlebt haben und wie lange sie nach der Immobilisierung noch am Leben waren, wurde ein BrdU-Assay zum Nachweis der Proliferation und Vitalität der Zellen angewendet. Der Assay verlief aber nur einige wenige Male mit positivem Ergebnis, so dass eine eindeutige Aussage nicht möglich war. Vermutlich kam es aufgrund einer mangelnden Ernährung zu einer Lyse der immobilisierten Schwammzellen und dadurch zum Auflösen der Kugeln nach ca. zehn Tagen. Für einen Identitätsnachweis der Zellen, wurden für *A. polypoides* und *S. domuncula* Primersysteme entwickelt, mit denen die immobilisierten Zellen als Schwammzellen identifiziert wurden, so dass eine Kontamination der Kultur mit schwammähnlichen Organismen nahezu ausgeschlossen werden kann.



Summary

In the present study extended attempts were performed to develop new methods and to optimize already applied methods for a continuous and sustainable cultivation of sponges under *ex-situ* condition. During many experiments several different cultivation parameters (e.g. water temperature, direct lightning, or nourishment) were investigated for their impact on vitality and growth of sponges. For this purpose specimens of several Mediterranean sponge species were transplanted from their natural habitats and cultivated under completely artificial conditions. Four different methods of the *ex-situ* cultivation of sponges were investigated: (1) cultivation of sponge fragments, (2) multicellular reaggregates of dissociated sponge cells (MZRA), (3) germination of sponge gemmules and (4) the immobilization of dissociated sponge cells. For the cultivation experiments special carriers were developed in which the fragments, MZRA and gemmules were inserted to force the samples to grow exclusively two-dimensionally. Due to this kind of cultivation the determination of vitality, growth and biomass of fragments, MZRA and gemmules could be done by measurements of the projection area using photographs. The method was easy to use, cost-efficient and reliable and had no negative effect on the vitality of the sponges.

Suitable species for fragmentation and for the production of MZRA were determined via screening. With these species several investigations were carried out to determine the impact of different cultivation parameters. As a result of these experiments distinct differences among the suitability presumably as an effect of the different ecological requirements of the species were found. Among the investigated cultivation parameters the water temperature had the largest impact on the vitality of the sponge fragments. It was found that the closer the experimental water temperature was to the natural conditions the greater the increase the number of vital fragments over cultivation duration. Moreover, it was found that the capability to and toleration range of changes in water temperature is very small and seems to be species specific. Therefore, observed temperature effects cannot universally adopted on sponge vitality from one species to another. In the experiments on the impact of direct lightning or shading on the cultivation success of fragments limitation of illumination not only affected photophilous species, e.g. *Aplysina aerophoba*, but also (semi)-cryptic species such as *Suberites domuncula*. If illumination was limited by shading with a cover or algal blooms fragments of *A. aerophoba* and *S. domuncula* reorganised their tissue structure and body shape or reduced their projection area strongly and died. Furthermore, an influence of initial fragment size on the survival rate was found.

The smaller the fragment the less cortical tissue and internal aquiferous channel system were present for the uptake of nutrients and oxygen from the ambient water and to maintain the ability of reorganisation. Thus, transport of nutrients and oxygen in the tissue was limited which induced starvation and anoxia that way and the fragments died after a few days or weeks. A minimal proportion of one third of cortical tissue and aquiferous system of the whole volume is necessary to survive. However, the amount of the minimal proportion of cortical tissue and aquiferous system necessary could be species specific and must be higher in other species. Adequate nourishment of the fragments was considered as the most important factor which influences survival of fragments in *ex-situ* cultivation. In several investigations fragments were fed with food particles and dissolved substances. It could be shown that the fragments were able to take up the particle and substances, however the fragments did not grow. Therefore, it is assumed that one or more essential substances were missing in the diet. Sustained growth of approximately 300 % increase in projection area per year was measured only in the sponge species *S. massa*. However, it was not possible to determine the factor(s) and circumstances which effected the sustainable growth of the species to project it into a cultivation or media design for other species.

Multicellular reagggregates (MZRA) of tissue of the sponge species *Axinella polypoides* and *S. domuncula* were produced due to chemical and mechanical dissociation. After a few days in the culture dishes with dissociated cells of both species small spheroid reagggregates with a diameter of 1 - 3 mm were visible. No differences were detectable in the formation process of MZRA in the very first stages of the species. The MZRA were alive and cultivated for a time span of 4 - 8 weeks. An effect of the water temperature on the formation process and the survival rate of the MZRA was determined. In higher water temperatures less MZRA were formed or rather those MZRA died faster compared with MZRA cultivated at colder water temperatures. Furthermore, the formation of MZRA was found to be affected by the percentage of cortical tissue of the dissociated tissue sample. Tests for the possibility of nourishing MZRA with food particles and dissolved substances were not successful as over weeks no aquiferous system was established within MZRA. The lack of an efficient aquiferous system did not permit MZRA growth and they died after 4 - 8 weeks in cultivation. In preliminary experiments it was shown that gemmules of *S. domuncula* germinate in cultivation carriers and develop into functional sponges. The young sponges could be kept alive in cultivation for 3.5 - 5 months. An attempt was made to influence the germination by changing water temperature or deep temperature pulses to break present dormancy states.

An initiation of germination of the inserted gemmules in an appointed time span or to a given point of time was not possible. Moreover, it was impossible to determine if only one factor is responsible for the non-appearance of a germination process or if germination is hampered by a combination or interaction of several factors. Attempts to nourish the gemmules and develop young sponges with a diet of food particles or complex culture media were not successful. Food uptake by the gemmules and young sponges was limited due to the lack of an efficient aquiferous system. Thus, the gemmules and young sponges died shortly after the consumption of the yolk-platelets, which are located in specific cells.

Two matrix substances were used for the immobilisation of dissociated sponge cells as three-dimensional culture. Both substances were tested to immobilise cells of *Axinella polypoides* and *S. domuncula* in order to produce the smallest viable sponges, and for a possible usage of this cultivation method in bioreactors for biomass production. For encapsulation a mixture of cell suspension and immobilisation matrix was dropped into CaCl₂ or PDADMAC. The procedure generated relatively stable spheres with a diameter of approx. 1 - 3 mm. A BrdU-Assay was applied to test whether the sponge cells survive the immobilisation process and to determine how long they are still alive when being encapsulated in the spheres. The assay should prove a proliferation of the immobilised cells as sign of vitality. The assay yielded only few positive results due to the very low proliferations rate. Inefficient nourishment probably caused a self-lysis of the encapsulated immobilised cells, and the spheres disintegrated after 10 days.

Two primer systems for *A. polypoides* and *S. domuncula* were developed to prove the identity of the immobilised cells being sponge cells and to exclude the possibility of contamination with sponge similar organisms such as e.g. Thraustochytrids. To test the identity of the immobilised cells the DNA of the cells encapsulated in several immobilisation spheres was extracted and amplified in a PCR reaction. With the developed primer systems the identity of the cells could be proven and a contamination of the reaction agents or DNA samples of sponge similar organism could be excluded.



1. Einleitung

Schon seit der Antike werden Schwämme im täglichen Leben genutzt (SCHMIDT 1862). Neben der Verwendung als Badeschwämme für die Körperhygiene, wurden Schwämme seit dem Mittelalter in Arabien und später auch in Europa als Heilmittel zur Behandlung des Jodmangelstrumas, oder als Hilfsmittel in der Chirurgie benutzt (BUSCH *et al.* 1844), sowie als Putzschwamm oder zum Filtrieren von Wasser. Neben diesen „klassischen“ Einsatzfeldern tat sich im 20. Jahrhundert durch die Entdeckung von Naturstoffen in Schwämmen ein weit wichtigerer Anwendungsbezug auf, der zukünftig für die Pharmaindustrie und die moderne Medizin von großer Bedeutung sein könnte.

In der marinen Schwammart *Cryptotethya crypta* wurden von BERGMANN & FEENEY (1951) außergewöhnliche Nucleoside entdeckt, die als Spongothymidin bzw. -uridin bezeichnet wurden. Diese Substanzen fungierten als Vorlage für die Entwicklung von Wirkstoffen wie z.B. Aciclovir, Vidarabin, und Cytarabin (MÜLLER *et al.* 1977a, b, CHABOT *et al.* 1983). Bis heute wurden mehr als 18.000 Naturstoffe aus marinen Organismen, vorwiegend in Schwämmen, entdeckt und beschrieben (FAULKNER 2000a, b, 2002, PROKSCH *et al.* 2002, THAKUR & MÜLLER 2004, BLUNT *et al.* 2004, 2008). Für umfangreiche Studien, werden größere Mengen der aufgereinigten Substanzen (z.B. Sekundärmetabolite) benötigt und damit verbunden auch größere Mengen an Schwammbiomasse, aus der die Metabolite extrahiert werden (SIPKEMA *et al.* 2005a). Aufgrund dessen, dass die Substanzen nur in sehr geringen Konzentrationen in den Organismen enthalten sind, wäre eine umfangreiche Wildernte großer Mengen an Biomasse zur Substanzgewinnung nötig. Eine solche Vorgehensweise scheidet aus ökonomischer, vor allem aber aus ökologischer Sicht aus (MENDOLA 2003, SIPKEMA *et al.* 2005a). Die Versorgung mit einer ausreichenden Menge Schwammbiomasse stellt deshalb das grundlegende Hindernis in der Untersuchung der Substanzen und der Entwicklung von pharmakologischen Mitteln dar und wird als „supply problem“ bezeichnet (OSINGA *et al.* 2000).

Des Weiteren ist die Frage nach den Produzenten der Sekundärmetabolite häufig noch ungeklärt. Es hat sich in mehreren Fällen herausgestellt, dass die Sekundärmetabolite nicht von Schwämmen gebildet werden, sondern auf Syntheseleistungen von schwammassoziierten Mikroorganismen zurückgeführt werden können (FAULKNER *et al.* 2000a, IMHOFF & STÖHR 2003). In einigen Fällen konnten die Mikroorganismen isoliert, identifiziert und kultiviert werden, um die Sekundärmetabolite zu gewinnen (STIERLE *et al.* 1988, UNSON & FAULKNER 1993). Bisher ist es aber nur möglich ca. 0,1 - 1 % der schwammassoziierten Mikroorganismen zu kultivieren (FRIEDRICH *et al.* 2001, KAEBERLEIN *et al.* 2002, TOLEDO *et al.* 2006).

Einen möglichen Ausweg könnten molekularbiologische Methoden bieten, die zur Charakterisierung von Biosynthese-Genclustern, z.B. für Polyketide oder zyklische Peptide aus der Schwammart *Theonella swinhoei* genutzt wurden (PIEL *et al.* 2004, FIESELER *et al.* 2007). Eine Klonierung der Biosynthese-Gene und ihre gezielte Expression in einem leicht kultivierbaren Bakterium, zur umfangreichen Sekundärmetabolitproduktion, ist momentan aber noch nicht verwirklicht (PROKSCH *et al.* 2006). Eine chemische Synthese der Sekundärmetabolite ist häufig bedingt durch die Komplexität der Moleküle nicht möglich und wäre aufgrund der meist mehr als 30 - 40 Schritte umfassenden Synthese nicht ökonomisch anwendbar (POMPONI & WILLOUGHBY 1994). Bedingt durch diese Umstände, bleibt für einen Großteil der Sekundärmetabolite weiterhin nur die Gewinnung über die Extraktion aus Schwammbiomasse. Ausreichende Mengen der Substanzen könnten aufgrund der beschriebenen Probleme nur durch eine gezielte Kultivierung von Schwämmen in Verbindung mit ihrer assoziierten, mikrobiellen Gemeinschaft produziert werden (OSINGA *et al.* 1999a).

Bemühungen einer gezielten Kultivierung von funktionellen Schwämmen und Schwammfragmenten im natürlichen Habitat, *in-situ*, mit Marikulturen, wie sie seit dem 19. Jahrhundert unternommen wurden zu realisieren, verliefen nur mit geringem Erfolg (ARNDT 1933, OSINGA *et al.* 1998). Heutzutage ist es dagegen möglich, Schwämme und andere marine Organismen, z.B. Bryozoen oder Tunicaten, die ebenfalls Sekundärmetabolite bilden und vergleichbare ökologische Ansprüche haben, mit gewissem Erfolg zu kultivieren (DUCKWORTH *et al.* 1999, MENDOLA 2003, DUCKWORTH & BATTERSHILL 2003a, VAN TREECK *et al.* 2003, DAHMS *et al.* 2007, SHARP *et al.* 2007). Dabei ist die Kultivierung von Bryozoen gegenüber Schwämmen deutlich einfacher und der Kultivierungserfolg höher (LARSEN *et al.* 1998). Die *in-situ* Kultivierung von Schwämmen oder Bryozoen birgt aber auch Probleme. Auf Schwankungen externer Systemfaktoren, z.B. der Wassertemperatur, der Salinität und der Nahrungsverfügbarkeit kann kaum Einfluss genommen werden, wodurch die Produktivität von Marikulturen sehr variabel ist (OSINGA *et al.* 1997). Die *ex-situ* Kultivierung, mit konstanten und definierten optimalen Lebensbedingungen, die teilweise verhältnismäßig leicht beeinflusst werden können, z.B. die Wassertemperatur, bietet Schwämmen dagegen deutlich höhere Überlebenschancen und Wachstumsmöglichkeiten als im natürlichen Habitat. Eine dauerhafte Kultivierung von Bryozoen in Tanks wurde bereits erfolgreich realisiert und die Anforderungen der Organismen an die Kultivierungsbedingungen sind relativ gut untersucht (MENDOLA 2000, HALE *et al.* 2002, MENDOLA *et al.* 2006). Auch die *ex-situ* Kultivierung von Süßwasserschwämmen konnte bereits erfolgreich realisiert werden (WEISSENFELS & LANGENBRUCH 1985, MÜLLER *et al.* 1999).

Die dauerhafte *ex-situ* Kultivierung von marinen Schwämmen, in Form von funktionellen Individuen oder Schwammfragmenten, stellt dagegen immer noch ein Problem dar. Es wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um die bestehenden Probleme einer *ex-situ* Kultivierung zu lösen und den Kultivierungserfolg zu verbessern, aber bisher konnte keine ideale Lösung gefunden werden (OSINGA *et al.* 1999a, SIPKEMA *et al.* 2005a). Weiterhin ist für die *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen häufig nicht detailliert geklärt, in wie weit verschiedene physikalische und biotische Faktoren für eine dauerhafte und nachhaltige Kultivierung von essentieller Bedeutung sind. Derartige Kenntnisse stellen jedoch essentielle Grundvoraussetzungen für die Etablierung einer erfolgreichen *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen dar.

Ebenso problembehaftet wie die Kultivierung, ist die exakte Bestimmung des Wachstums und der Biomasse von Schwämmen. Um diese berechnen zu können, wurden verschiedene Modelle und Methoden entwickelt, die aber bisher keine genaue und reproduzierbare Möglichkeit der Wachstums- und Biomassenbestimmung bei Schwämmen bietet (OSINGA *et al.* 1999c, NICKEL *et al.* 2004, SIPKEMA *et al.* 2006, CAMACHO *et al.* 2006b). Bestimmungen des Volumens mittels Wasserverdrängung, wie sie bei Bryozoen angewendet werden, sind bei vielen Schwammarten, aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Sauerstoff bzw. durch drohende Embolien, nicht möglich (OSINGA *et al.* 1999a). Zudem können bei Schwämmen periodische, möglicherweise saisonal bedingte Wachstums- und Reduktionsvorgänge auftreten, die eine genaue Bestimmung der Biomasse erschweren (ELVIN 1976).

Fragestellungen und Ziele

Hauptziel dieser Arbeit ist es, neue Methoden zur *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen zu entwickeln bzw. bereits angewandete Kultivierungsmethoden für eine dauerhafte und nachhaltige Anwendung zu optimieren. Maßgebliche Eckpunkte sind dabei, dass die zu entwickelnden Methoden einfach anwendbar und kostengünstig sein sollten und ein dauerhaftes Überleben der Schwämme garantieren können. Des Weiteren soll die Frage untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene Faktoren, z.B. die Wassertemperatur, Licht oder die Nahrungsversorgung auf das Schwammwachstum haben und in wie weit diese Parameter für ein kontinuierliches Wachstum der Schwämme unter künstlichen Bedingungen optimiert werden können. Daneben sollen geeignete Methoden zur Bestimmung des Wachstums und der Biomasse der kultivierten Schwämme gefunden und optimiert werden.

2. Grundlagen

2.1 Marine Naturstoffe

Sessile Tiere, z.B. Schwämme (lateinisch: *Porifera*, von *Porus* - die Öffnung und *ferre* - tragen) oder Seescheiden (lateinisch: *Tunicata*), sind vielfach nicht durch verstärkte, teilweise kalzifizierte Skelettstrukturen, z.B. Panzer oder Stachel geschützt (mechanischer Schutz) (PROKSCH *et al.* 2006). Zudem haben sie nicht die Möglichkeit, sich möglichen Gefahren durch Fortbewegung und Flucht zu entziehen (CHANAS & PAWLICK 1996). Aufgrund der fortwährenden Bedrohung durch Fraßdruck haben diese Phyla eine chemische Abwehr durch toxische Substanzen, so genannte Sekundärmetabolite entwickelt, die im Kampf mit intra- und interspezifischer Konkurrenz um begrenzte Lebensräume eine gewichtige Rolle spielen (SCHMAHL 1991, NICKEL *et al.* 2000, ENGEL & PAWLICK 2005).

Anfang der fünfziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, rückten auf der Suche nach Quellen für neue Naturstoffe marine Bereiche und Organismen in den Blickpunkt der Wissenschaft. Diese Entwicklung erhielt immensen Aufschwung als BERGMANN & FEENEY (1951) außergewöhnliche Nucleoside in der Schwammart *Cryptotethya crypta* entdeckten. Die entdeckten Naturstoffe fungierten als Leitsubstanzen für die spätere Entwicklung von Wirkstoffen in der Humantherapie, z.B. Aciclovir, Vidarabin bzw. Cytarabin (MÜLLER *et al.* 1977a, b, CHABOT *et al.* 1983, ZEECK *et al.* 2001). Der entscheidende Impuls, die marine Biosphäre eingehender nach potentiellen Wirkstoffen zu durchsuchen erfolgte aber erst 15 Jahre später, nach der Entdeckung von Prostaglandinen in der Hornkoralle *Plexaura homomalla* (WEINHEIMER & SPRAGGINS 1969). Seitdem wurden mehr als 18.000 Naturstoffe aus marinen Organismen, hauptsächlich aus Porifera (Abb. G 1) isoliert und beschrieben (DUMDEI *et al.* 1998, MUNRO *et al.* 1999, GRABLEY & THIERICKE 1999, KOBAYASHI 2000, FAULKNER 2000a, b, 2002, PROKSCH *et al.* 2002, THAKUR & MÜLLER 2004, BLUNT *et al.* 2008).

Isolierte Naturstoffe aus Schwämmen sind z.B. (Isoxazolin-)Alkaloide, (Depsi-)Peptide, Acetogenine oder Terpenoide und verschiedene Pigmente (3.1.3.1 - 3.1.3.4) (CIMINO *et al.* 1984, EBEL *et al.* 1997, PROKSCH *et al.* 2006). Die Wirkung derartiger Substanzen reicht von antifunghizid über cytotoxisch, antibakteriell, antiviral, anti-inflammatorisch (SCHMITZ 1994, PROKSCH *et al.* 2006), und aufwuchshemmend bis hin zu anti-Biofouling (MUNRO *et al.* 1994, FUSETANI 2004).

Beispielsweise haben das aus der Schwammart *Dysidea avara* extrahierte Sesquiterpenderivat Avarol (MINALE *et al.* 1974) und seine Oxidationsform Avaron (Abb. G 2) nicht nur cytotoxische Wirkung und antivirale Aktivität, sondern hemmen auch die Reverse Transkriptase des HI-Virus 1 (MÜLLER *et al.* 1987a, b, SARIN *et al.* 1987). Derivate der beiden Substanzen sind zurzeit in der klinischen Prüfung als mögliche Medikamente gegen HIV und AIDS (DUARTE *et al.* 2002, SARMA 2004).

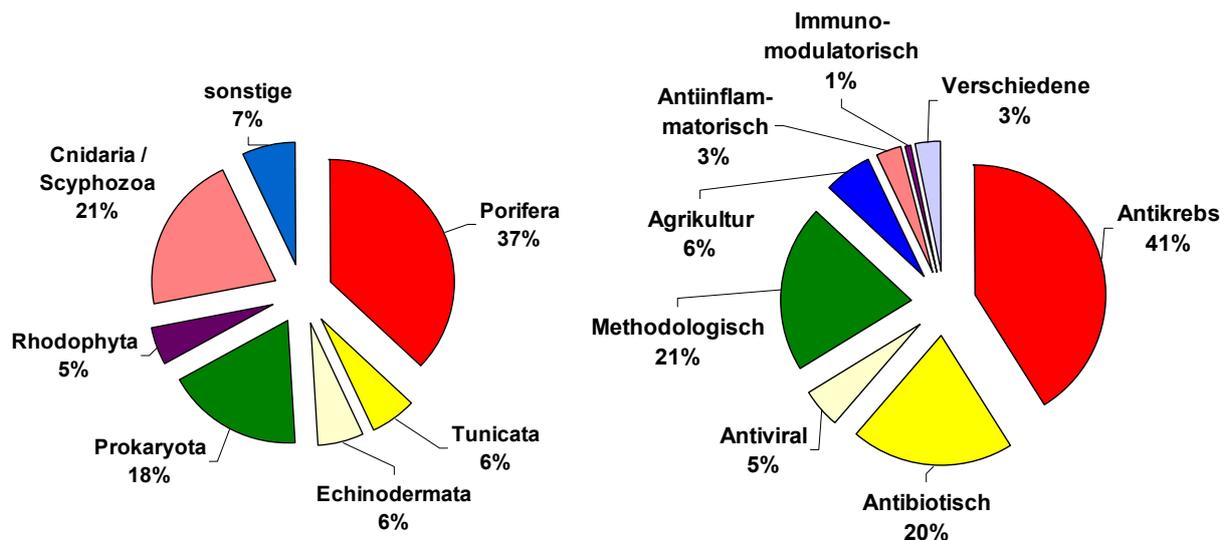


Abb. G 1: Aufteilung der im Jahr 2004 neu entdeckten und beschriebenen Substanzen extrahiert aus marinen Organismen nach Phylum (links) und Wirkung (rechts). Für ein besseres Verständnis wurden die Wirkungen der isolierten bioaktiven Substanzen in acht, hauptsächlich Krankheitsbezogene Gruppen eingeteilt. Die Gruppe „Verschiedene“ umfasst neurologische, Blutdruck-, Fruchtbarkeits-, Allergiebasierende- und Enzymaktivitätsassays. Die Gruppe „Methodologisch“ umfasst Bioassaymethoden, Aktionsmechanismen, Strukturaktivitätsstudien, Radioimmunoassays und andere Assays (nach: BLUNT *et al.* 2004, 2006, verändert).

Auch ein chemisch synthetisiertes Derivat, des aus *Halichondria okadai* (HIRATA & UEMURA 1986) bzw. *Lissodendoryx* sp. (MUNRO *et al.* 1999) isolierten, makrozyklischen Lactons Halichondrin B (Abb. G 2) (HART *et al.* 2000), bezeichnet als Isohomohalichondrin B (BAI *et al.* 1991, LITAUDON *et al.* 1994), befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung (Phase II - III) und könnte als antimitotischer Wirkstoff gegen Leukämie fungieren (LAMBERT & BURKE 2002, SIPKEMA *et al.* 2005a, b). Andere Substanzen könnten als Leitsubstanzen für zukünftige Medikamente gegen Malaria und Formen von Krebs, z.B. Leukämie oder Brustkrebs eingesetzt werden (MCKEE *et al.* 1994, KIKUCHI *et al.* 2001).

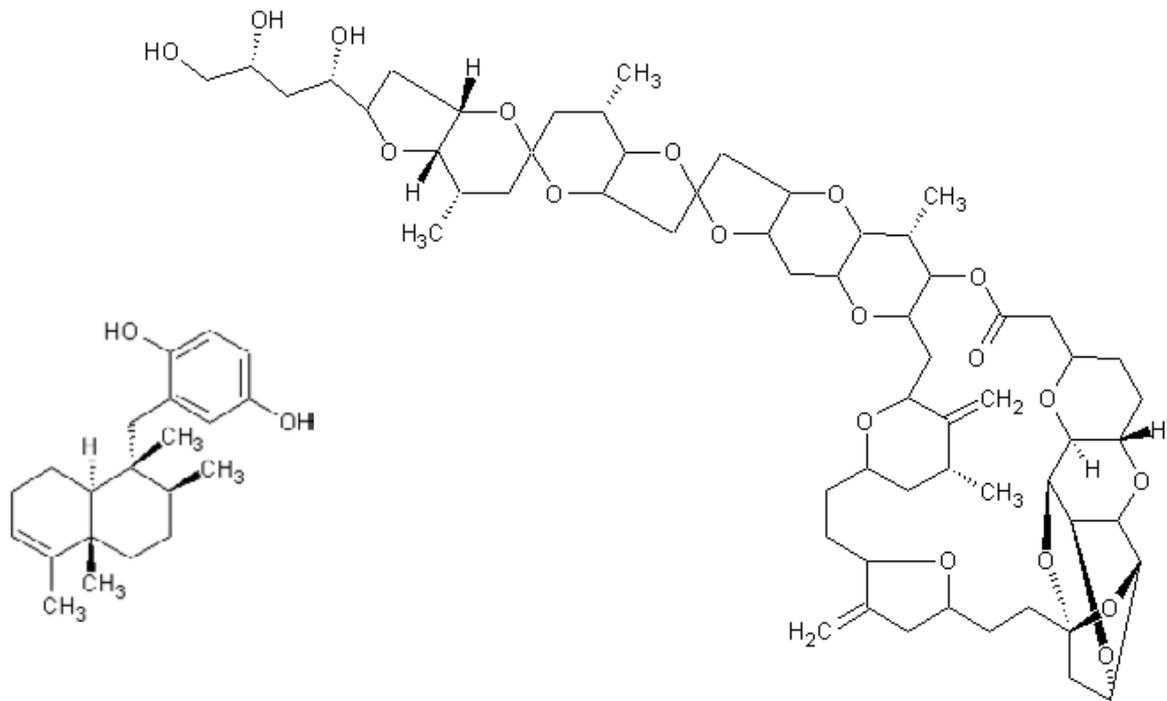


Abb. G 2: Strukturformeln der bioaktiven Substanzen Avarol (links) und Halichondrin B (rechts), die aus den marinen Schwammarten *Dysidea avara* (MINALE *et al.* 1974) bzw. *Halichondria okadai* (HIRATA & UEMURA 1986) und *Lissodendoryx* sp. (LITAUDON *et al.* 1994) extrahiert wurden.

Des Weiteren kann die Erforschung der Naturstoff-Biosynthese und der molekularen Wirkungsmechanismen helfen, neue pharmakologische Angriffspunkte aufzudecken, um innovative Therapiewege zur Behandlung von Krankheiten zu eröffnen.

2.2 Biologie der Schwämme

Einteilung und Vorkommen

Schwämme stellen das evolutionär älteste Phylum innerhalb der Metazoa dar. Ein erstes Auftreten dieses Phylums vor ca. 600 - 800 Mio. Jahren wird durch Fossilienfunde aus dem frühen Kambrium belegt (BERGQUIST 1978, WILLMER 1994, LI *et al.* 1998, MÜLLER 2001, BERGBAUER 2002). Der Stamm Porifera wurde als solches 1836 von GRANT eingeführt, letztendlich die Zuordnung zu den Tieren erfolgte erst 1896 durch HAECKEL. Momentan sind weltweit ca. 7.500 - 8.000 rezente Arten bekannt, Schätzungen gehen aber davon aus, dass sich die Zahl noch deutlich erhöhen könnte (HOOPER & VAN SOEST 2002).

Der weitaus größte Teil der Schwämme lebt in marinen Habitaten und ist vom Eulitoral (trophogene Zone) bis in die Tiefsee verbreitet. Evolutionär gesehen jünger sind die ca. 150 Schwammarten, die im Süßwasser verbreitet sind (HOOPER & VAN SOEST 2002).

Verbreitung

Porifera kommen ausschließlich im Wasser, von den Tropen über gemäßigte Breiten, bis in arktische und antarktische Gebiete vor (REISWIG 1973, CARBALLO *et al.* 1997, CERRANO *et al.* 2000, GATTI 2002). Die größte Diversität und Abundanz ist dabei in den Tropen zu finden (OSINGA *et al.* 1999a, b, DIAZ & RÜTZLER 2001). Im Brackwasser fehlen die Hexactinellida (Glasschwämme) (s. u.), sowie die Calcarea (Kalkschwämme) und auch Demospongia (Hornkieselschwämme) sind hier selten (BRÜMMER *et al.* 2003). Allgemein sind Schwämme durch eine sessile Lebensweise gekennzeichnet. Sie heften sich bevorzugt an Hartsubstrat fest, kommen aber auch auf schlammigen Untergrund vor (MÖHN 1984, VAN SOEST 1996).

Schwämme wachsen sehr langsam ($< 33\%$ Zuwachs Jahr⁻¹, BERGBAUER 2002), können bis zu 10.000 Jahren alt, z.B. *Scolymastra joubini* (GATTI & BREY 2002) und bis zu 2 m groß werden, z.B. *Xestospongia muta* (WILKINSON 1978). Ihre Verbreitung ist abhängig von verschiedenen Parametern, z.B. Lichtexposition, Strömungsverhältnissen, Wassertemperatur und Nahrungsangebot (WILKINSON & VACELET 1979, OSINGA *et al.* 1999a, b). Fluktuationen dieser Parameter können sich negativ auf die Vitalität der Schwämme auswirken, oder sich als Veränderungen im Habitus manifestieren (BIDDER 1923, WILKINSON & VACELET 1979, BONASORO *et al.* 2001).

Morphologie

Die Habitusform von Schwämmen ist äußerst variabel, durch hohe Plastizität gekennzeichnet und kann durch physikalische Kräfte, z.B. Wellenschlag in der Eulitoralzone, sowie starke Strömungen beeinflusst werden (BIDDER 1923). Schwämme können als Einzeltiere, oder als flächendeckende Kolonien vorkommen (3.1.3.1 - 3.1.3.4). Dabei ist die Individualität innerhalb des Stammes Porifera weit geringer ausgeprägt, als bei anderen Phyla. Zwei Individuen einer Art können miteinander verschmelzen und einen neuen, gemeinsamen Organismus bilden (MÖHN 1984).

Neben der Habitusform ist auch die Färbung der Schwämme häufig sehr variabel ausgeprägt. Die farbgebenden Stoffe sind in den äußeren Zellschichten des Schwammgewebes lokalisiert und die Körperfärbung beruht auf einem Zusammenspiel unterschiedlicher Carotinoide (LIAAEN-JENSEN 1991, BINDER 2007). Neben den von Schwämmen gebildeten Carotinoiden, kann die Färbung auch durch vergesellschaftete Mikroorganismen, z.B. Algen oder Cyanobakterien verursacht bzw. beeinflusst werden (LIAAEN-JENSEN 1991, BINDER 2007).

Anatomie und Physiologie

Im Wesentlichen ist der Schwammkörper aus zwei einfachen, einschichtigen Epithelien aufgebaut. Die äußere, sehr dünne Schicht (ca. 1 μm) wird als Pinacoderm bezeichnet und setzt sich aus plattenartigen, flachen Zellen ohne Wimpern, den Pinacocyten zusammen (Abb. G 3). Das Pinacoderm ist von vielen Poren (Ostien) durchbrochen, durch die der Schwamm Wasser und Nahrungspartikel einstrudelt. Nach innen wird der Körper durch das Choanoderm abgegrenzt. Es setzt sich aus einer Vielzahl begeißelter Kragengeißelzellen (Choanocyten) zusammen. Alle durch diesen Zelltyp gebildeten und ausgekleideten Hohlräume innerhalb des Schwamms werden als Choanocytenkammern bezeichnet. Der Raum zwischen beiden Epithelien wird als Mesohyl bezeichnet. Es handelt sich dabei um ein gallertartiges, kolloidales Gel, das ein anorganisches Stützskelett aus nadelähnlichen Strukturen, als Spicula oder Sklerite bezeichnet, enthält. Neben der skelettstützenden Funktion werden Spicula auch zur Verankerung im Boden, zum Beutefang und als Lichtleiter ins Innere des Schwammkörpers genutzt (BRÜMMER *et al.* 2003).

Aufgrund ihres Skelettaufbaus und der chemischen Zusammensetzung der Spicula werden Schwämme in drei Klassen eingeteilt: Calcarea, Hexactinellida und Demospongia (BERGQUIST 1978, HARTMANN 1983, SIMPSON 1984, VAN SOEST *et al.* 2000).

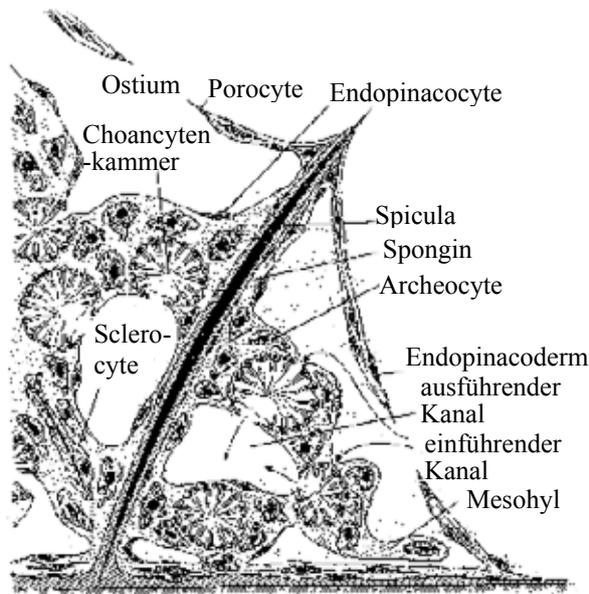


Abb. G 3: Schematischer Aufbau eines Schwammes. Gezeigt werden die einzelnen Schichten des Schwammkörpers (nach: AX 1996, verändert).

Die Form der Spicula wird dabei als artspezifisches Merkmal zur taxonomischen Bestimmung herangezogen (BOURY-ESNAULT & RÜTZLER 1997). Calcarea haben Spicula aus CaCO_3 , Hexactinellida und Demospongia besitzen Kieselsäure-Spicula (GRUNER 1993, BRÜMMER *et al.* 2003). Daneben werden in der letzt genannten

Klasse zusätzlich Proteinfasern, so genannte Sponginfasern, (Abb. G 3) gebildet (BERGQUIST 1978, BRÜMMER *et al.* 2003). Die meisten der rezent vorkommenden Schwammarten (ca. 95 %) werden in die Klasse der Demospongiae eingeordnet (BERGQUIST 1978).

Die Organisationsstufe des Phylums Porifera ist relativ niedrig. Der sack- oder flaschenähnlich aufgebaute Körper besitzt ein Wasserkanalsystem, das zur Nahrungsaufnahme und zur Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten dient (MÖHN 1984). Die Gesamtheit des Wasserleitungssystems im Schwamminneren wird als aquiferes System bezeichnet. Kleine Öffnungen, sogenannte Ostien (Abb. G 3), die über den ganzen Körper verteilt sind, ermöglichen die Aufnahme von nahrungshaltigem Wasser ins Schwamminnere. Ein koordinierter, gleichgerichteter Schlag aller Choanocytengeißeln in eine Richtung bewirkt die Erzeugung einer Wasserströmung durch die Choanocytenkammern (WESTHEIDE & RIEGER 1996), durch die planktonhaltiges Wasser ins Schwamminnere eingestrudelt wird. Mit dem Wassertransport durch das aquifere System erfolgt auch der Gasaustausch. Ionen, die für den Spiculaaufbau nötig sind, werden ebenfalls aus dem Wasser gewonnen (MÜLLER *et al.* 1999, 2004a, VALISANO *et al.* 2006a, b). Ausgehend von der Anordnung der Choanocytenkammern und dem prinzipiellen Organisationsprinzip des Schwammkörpers lassen sich drei verschiedene „Bauplan-Typen“ unterscheiden: Ascon-, Sycon- und Leucontyp (Abb. G 4). Im Laufe der Höherentwicklung innerhalb des Stammes Porifera kam es zur einer Einfaltung von Epithelien ins Innere, die zu einer Oberflächenvergrößerung innerhalb der zuführenden Kanäle führte, die wiederum eine deutlich gesteigerte Effizienz der Filterleistung bewirkte (MÖHN 1984, VAN SOEST 1996). Die überwiegende Zahl der rezenten Schwammarten weist einen Bauplan des Leucontyps auf.

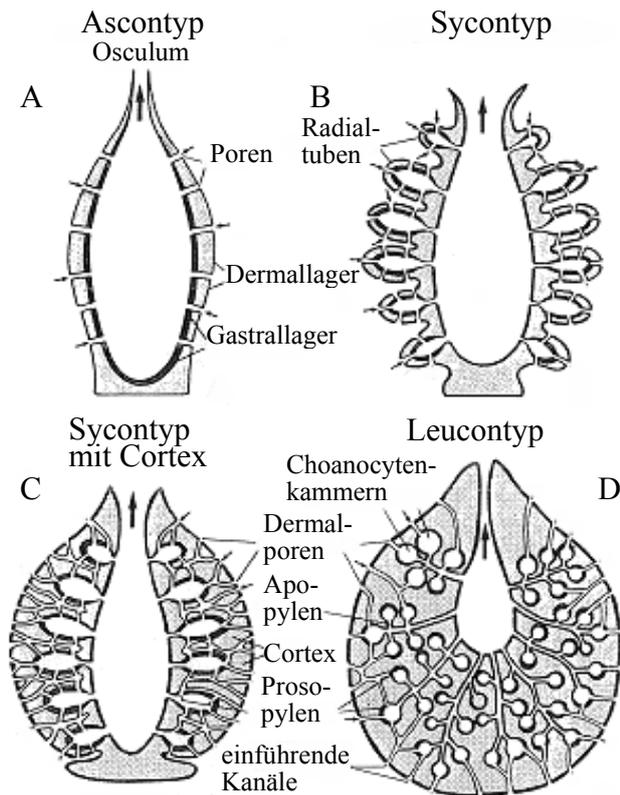


Abb. G 4: Schematischer Bauplan der einzelnen Organisationsstufen: A - Ascontyp, B - Sycontyp, C - Sycontyp mit Cortex und D - Leucontyp (nach: GRUNER 1993, verändert). Das Choanocytenepithel ist durch verstärkte Linien hervorgehoben. Der Wasserausstrom bzw. die Strömungsrichtung durch das Osculum ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Ernährung

Mit Ausnahme weniger Vertreter, z.B. *Asbestopluma* sp. (VACELET & DUPORT 2004), ernähren sich Schwämme als Suspensionsfiltrierer (PILE 1997, RIBES *et al.* 1999a, b). Neben der Nutzung passiver Strömung erzeugen Schwämme selbstständig einen Wasserstrom, durch den Nahrungspartikel eingestrudelt werden (VOGEL & BRETZ 1971). Im Wasser schwebende Partikel (einzellige, Algen, Bakterien und Detritus) werden als Nahrung genutzt, wobei Bakterien mit ca. 75 % den Großteil der aufgenommenen Nahrung ausmachen (BELL *et al.* 1999, RIBES *et al.* 1999a, b). Es kommt zu einer nicht selektiven Ernährung. Durch die Öffnungsweite der Poren gelangen Partikel, die kleiner als 50 μm sind, ins aquifere System und werden phagozytiert (REISWIG 1971, 1975a, b, PILE *et al.* 1996, VAN SOEST 1996, OSINGA *et al.* 1999a). Dabei steigt die Aufnahmerate bzw. Filtrationsrate der Schwämme mit zunehmender Partikeldichte bis zu einem Schwellenwert an, ab dem Schwämme durch eine Blockade der Choanocytenkammern nahrungsinhibiert werden (POIRRIER *et al.* 1981, DUCKWORTH *et al.* 2003). In den Zellen (Archaeocyten, Choanocyten, Abb. G 3) wird in verdauliche und unverdauliche Partikel unterschieden, wobei unverdauliche Partikel über Atrium und Osculum wieder ausgeschleust werden.

Neben der Aufnahme und Verwertung von partikulärer Nahrung können Schwämme auch gelösten, organischen Kohlenstoff aus dem Meerwasser als Energiequelle nutzen (STEPHENS 1968, SOUTHWARD & SOUTHWARD 1970, 1972, SEPERS 1977, CAMACHO *et al.* 2006a, b). Der im Meerwasser vorhandene organische Kohlenstoff (Total Organic Carbon, TOC) wird in gelösten, organischen Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon, DOC) und partikulären, organischen Kohlenstoff (Particulate Organic Carbon, POC) unterteilt, wobei der Anteil des DOC mit 97 % deutlich überwiegt (RIBES *et al.* 1999b, CAMACHO *et al.* 2006a). Der Großteil des DOC im Meerwasser liegt dabei in refraktärer Form vor, der für Schwämme nicht nutzbar ist, nur die „labile“ Form des DOC kann verwertet werden.

Von YAHIEL *et al.* (2003) wurde festgestellt, dass die Schwammart *Theonella swinhoei* bis zu 26 % TOC aus dem umgebendem Meerwasser aufnehmen kann, wobei der Großteil des aufgenommenen Kohlenstoffs ($10 \pm 7 \mu\text{Mol C l}^{-1}$) DOC war. Der Wert für die Kohlenstoffaufnahme in Form von DOC lag dabei eine Zehnerpotenz über dem Wert für die Kohlenstoffaufnahme aus POC (YAHIEL *et al.* 2003). In wie weit andere Schwammarten zur umfangreichen DOC-Aufnahme aus dem Wasser fähig sind, ist bislang nicht umfassend untersucht worden.

Assoziierte Mikroorganismen

Schwämme sind häufig mit einer großen Zahl von Mikroorganismen assoziiert (LEE *et al.* 2001, WANG 2006, TAYLOR *et al.* 2007). Momentan noch unklar ist allerdings, ob es sich bei der Form der Vergesellschaftung zwischen Schwamm und Mikroorganismen um eine Eusymbiose, oder eine andere Form der Interaktion handelt (THOMS 2004, WEHRL 2006). Häufig sind die Mikroorganismen in den äußeren, lichtexponierten Gewebeschichten von Schwämmen und im Mesohyl (Abb. G. 3) lokalisiert, bspw. photosynthetisch aktive Cyanobakterien (WILKINSON & VACELET 1979). Auch in den Schwammzellen sind Bakterien divers und abundant verbreitet und dort häufig in sogenannten „Bacteriocytes“ konzentriert (VACELET & DONADEY 1977, CHESHIRE & WILKINSON 1991, ILAN & ABELSON 1995). Der Massenanteil der Bakterien an der Gesamt-Biomasse des Schwamms kann 40 - 60 % ausmachen. Die Bakterienkonzentration im Schwammgewebe liegt ungefähr um das 100 - 10.000fache über der des umgebenden Meerwassers (FRIEDRICH *et al.* 1999, THOMS *et al.* 2003). Derartige Schwämme werden aufgrund ihrer hohen Bakterienkonzentration als „Bacteriosponges“ bezeichnet (HENTSCHEL *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu gibt es aber auch ausgesprochen bakterienarme Schwämme (VACELET & DONADEY 1977).

Hier liegt die Bakterienkonzentration nur bei $10^5 - 10^6$ Zellen g^{-1} Schwammfeuchtgewicht und entspricht damit in etwa der Konzentration an Bakterien im umgebenden Meerwassers (HENTSCHEL *et al.* 2003, 2006). Schwammassoziierte Bakterien können für den Wirtsschwamm weiterhin nicht nur als Nahrungsquelle fungieren, sondern auch als Lieferanten essentieller Substanzen, z.B. Stickstoffverbindungen dienen, die der Schwamm nicht selber synthetisieren kann (WILKINSON & FAY 1979, DIAZ & WARD 1997, OSINGA *et al.* 1999a).

Vermehrung

Die meisten Schwämme pflanzen sich geschlechtlich fort, sind aber auch in der Lage sich durch Fragmentierung, Knospung oder Abschnürung, die so genannte Budbildung, zu vermehren (AYLING 1980, MÖHN 1984, BATTERSHILL & BERGQUIST 1990, HOOPER 1997, HOOPER & VAN SOEST 2002). Fragmentierung bezeichnet die Reduktion des Schwammkörpers als Antwort auf ungünstige Umweltbedingungen, die zum Zerfall des Elternschwamms führt (GAINO *et al.* 2003). Diese Erscheinung tritt besonders häufig bei Süßwasserschwämmen auf. Die freigesetzten Fragmente und Buds werden mit der Strömung verdriftet, heften sich am neuen Standort fest und bilden sich wieder zum funktionellen Schwamm aus, so dass sie auf diesem Weg die Art verbreiten (HOOPER 1997, CORRIERO *et al.* 1996, 1998). Die Bud-Bildung scheint dabei stark von der Wassertemperatur abhängig zu sein (CORRIERO *et al.* 1998). Neben den schon genannten Formen der Vermehrung, haben Schwämme noch eine Dauerform, so genannte Gemmulae entwickelt (FELL 1974, 1975, CONNES 1977, 1978, MÖHN 1984, SCHILL *et al.* 2006), die zur Überwindung ungünstiger Lebensbedingungen dient (2.3.4, 3.2.3).

2.3 Theoretische Grundlagen

2.3.1 Methodische Ansätze

In den Bemühungen Schwammbiomasse zu züchten, werden momentan verschiedene Methoden, z.B. die Kultivierung von funktionellen Schwämmen, sowohl *in-situ* (Marikultur) als auch *ex-situ* (Aquakultur) angewendet (BELARBI *et al.* 2003, SIPKEMA *et al.* 2005a). Die *in-situ* Kultivierung von Schwämmen im natürlichen Habitat, ist dabei die am häufigsten genutzte Methode zur Biomassenproduktion (OSINGA *et al.* 1999a, SIPKEMA *et al.* 2005a). Für die Kultivierung werden Schwämme oder Schwammfragmente in Netzen, an Seilen oder auf Gittern fixiert und im Wasser hängend kultiviert (DUCKWORTH & BATTERSHILL 2003a, b, VAN TREECK *et al.* 2003). Diese Form der Kultivierung soll den kultivierten Schwämmen ideale Bedingungen für ein nachhaltiges Wachstum bieten. OSINGA *et al.* (1997, 1999a), DUCKWORTH & BATTERSHILL (2003b) und SIPKEMA *et al.* (2005a) beschreiben zudem, dass eine solche Kultivierungsform relativ günstig im Kosten : Nutzen-Verhältnis sein müsste. Bisherige Versuche, Schwammbiomasse *in-situ* zu züchten stellten sich aber als äußerst schwierig heraus und verliefen nur mit mäßigem Erfolg (OSINGA *et al.* 1998, 2000).

Der geringe Erfolg resultiert unter anderem aus dem Umstand, dass die *in-situ* Kultivierung von vielen externen Faktoren abhängig ist, z.B. Schwankungen der Wassertemperatur oder der Nahrungsversorgung, Wasserverschmutzung oder dem Auftreten von Krankheiten, auf die nur bedingt oder kein Einfluss genommen werden kann. Durch Fluktuationen der Kultivierungsbedingungen kann die Wachstumsrate der kultivierten Schwämme stark variieren, wodurch der Ertrag einer *in-situ* Kultur schwankt (DUCKWORTH *et al.* 1997, OSINGA *et al.* 1999a, SIPKEMA *et al.* 2005a, 2006).

Um nachteilige Fluktuationen in den Kultivierungsbedingungen zu minimieren, oder gänzlich auszuschließen, wurden Versuche unternommen, funktionelle Schwämme, Schwammfragmente (2.3.2), multizelluläre Reaggregate (2.4.2) oder Gemmulae (2.5.2) *ex-situ*, d.h. unter künstlichen Bedingungen zu kultivieren (OSINGA *et al.* 1998, KOZIOL *et al.* 1998, CUSTODIO *et al.* 1998, DE CARALT *et al.* 2003, SCHILL *et al.* 2006). Die *ex-situ* Kultivierung bietet im Gegensatz zur *in-situ* Kultivierung definierte Bedingungen, unter denen die Schwämme gehalten werden und die teilweise relativ leicht beeinflussbar sind, z.B. Temperatur, O₂-Gehalt oder Beleuchtung (OSINGA *et al.* 1999a). Dadurch wäre eine dauerhafte Kultivierung unter optimalen Bedingungen möglich. Eine erfolgreiche Züchtung von Schwammbiomasse im Bioreaktor würde die weitere Erforschung und Produktion von Sekundärmetaboliten von einer Wildernte unabhängig machen (OSINGA *et al.* 1999a).

Allerdings waren die Versuche Schwämme langfristig in *ex-situ* Kultivierung zu halten bisher nicht in dem Maße erfolgreich, wie angenommen wurde (OSINGA *et al.* 2001, 2003). Der Einfluss verschiedener Parameter, z.B. der Nahrungsqualität und -quantität oder Interaktionen zwischen Schwämmen und der umgebenden, endobenthischen Gemeinschaft auf die Vitalität und das Wachstum der kultivierten Schwämme, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, so dass eine Reproduzierbarkeit von durchgeführten Untersuchungen kaum gewährleistet werden kann. Dadurch ist es auch weiterhin schwierig, das komplexe Zusammenspiel von biotischen und abiotischen Faktoren, das im natürlichen Habitat herrscht, im Labor nachzustellen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf Schwämme zu untersuchen und die Kultivierung zu optimieren. In den nachfolgenden Abschnitten (2.3.2 - 2.3.5.4) werden die angewendeten *ex-situ* Kultivierungsmethoden und die verschiedenen, untersuchten, physikalischen und biotischen Parameter, die einen Einfluss auf das Überleben und Wachstum der Schwämme haben können vorgestellt.

2.3.2 Schwammfragmente

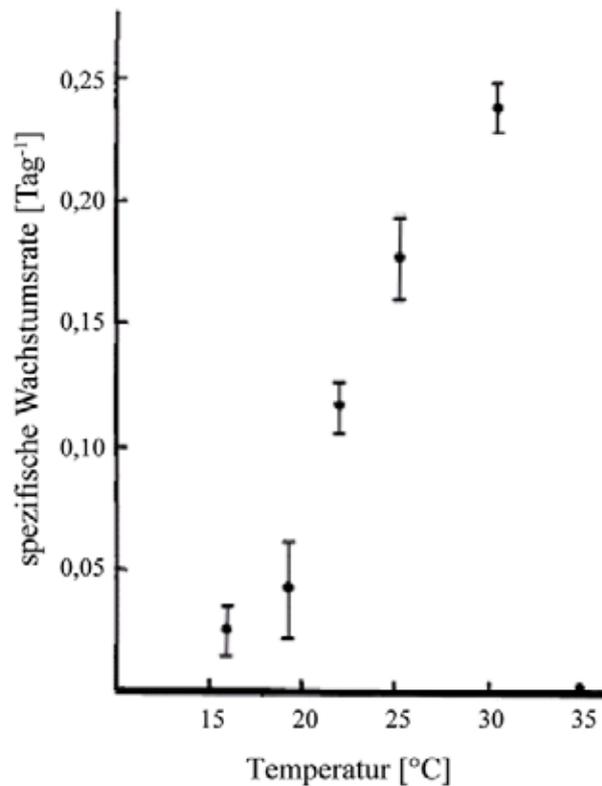
Eine schon seit der Antike angewandte Form der Kultivierung von Schwämmen ist die Verwendung von Schwammfragmenten, hergestellt durch das Zerteilen von funktionellen Individuen die in Netzen, an Seilen oder auf Gittern fixiert kultiviert werden (OSINGA *et al.* 1999a, DUCKWORTH & BATTERSHILL 2003a, b, VAN TREECK *et al.* 2003). Hierbei wird die Fähigkeit der Schwammzellen (Archaeocyten, Abb. G 3) genutzt, sich in jede andere Zellform differenzieren, eine durch Fragmentierung erlittene Verletzung zu heilen und sich wieder in einen funktionellen Schwamm reorganisieren zu können (AYLING 1981, HAUSMANN *et al.* 2006). Dabei wird angenommen, dass Schwammfragmente potentiell höhere Wachstumsraten als funktionelle Schwämme haben, wodurch eine größere Biomassenzunahme in kürzerer Zeit erreicht wird (KINNE 1977). Vorteile der Kultivierung von Schwammfragmenten gegenüber funktionellen Schwämmen bestehen außerdem im geringeren Platzbedarf der Kultureinheiten und im minimierten Aufwand zur Nahrungsversorgung.

2.3.2.1 Einfluss verschiedener Faktoren auf Schwammfragmente

Wassertemperatur

Innerhalb der letalen Grenzen (Hitzetod, Kältetod) übt die Wassertemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen und damit auch auf alle biochemischen und physiologischen Prozesse aquatischer Organismen aus. Dabei sind aquatische Organismen Temperaturwechseln ausgesetzt, die meist wesentlich langsamer und geringer ausfallen, als bei terrestrischen Organismen (SOMMER 1998). Ein Ansteigen der Wassertemperatur um ~ 10 °C verursacht eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit aquatischer Organismen um einen Faktor (Q_{10}) von 1,4 - 4 (SOMMER 1998). Physiologische Leistungen aquatischer Organismen haben ein Optimum, deren Effizienz oberhalb bzw. unterhalb des Optimums wieder abnimmt, da die an den meist mehrere Schritte umfassenden, biochemischen Reaktionen beteiligten Enzyme nur innerhalb eines bestimmten Bereiches funktionell sind. Haben die Einzelschritte unterschiedliche Q_{10} -Werte, kann außerhalb des Optimalbereichs die physiologische Funktion stark eingeschränkt werden.

Allgemein ist daher die Verbreitung von Organismen (ökologischer Toleranzbereich) meist auf einen wesentlich geringeren Temperaturbereich beschränkt, als es dem physiologischen



Toleranzbereich entsprechen würde (SOMMER 1998). Bei Organismen gemäßigter Meeresgebiete (3.1.1) liegt das ökologische Optimum meist bei höheren Temperaturen, als den im Habitat im Jahresverlauf auftretenden Wassertemperaturen (SOMMER 1998). Die Wachstumsrate von Schwämmen nimmt deshalb mit steigender Wassertemperatur zu und sinkt, sobald die Temperatur fällt (Abb. G 5). Ein Zunahme der Temperatur über den ökologischen, artspezifischen Toleranzbereich hinaus, führt zum absterben der Schwämme.

Abb. G 5: Spezifische Wachstumsraten von *Ephydatia fluviatilis* bei fünf verschiedenen Temperaturen. (nach: HARSHA *et al.* 1983, verändert).

Des Weiteren kann eine hohe Temperatur die Wundheilung von Schwammfragmenten nachteilig beeinflussen, indem die Dauer bis zur vollständigen Wiederherstellung des Pinacoderms deutlich verlängert wird (DUCKWORTH *et al.* 1997). Außerdem beeinflusst die Temperatur den Nahrungsbedarf von Schwämmen. RIISGÅRD *et al.* (1993) fanden heraus, dass bei Schwämmen, z.B. *Halichondria* sp., ein Ansteigen der Wassertemperatur um 6 - 12 °C eine Zunahme der Filtrationsrate um das $4,3 \pm 2,3$ -fache bewirkt. Durch die erhöhte Wassertemperatur würden Schwämme daher, im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen, mehr Nahrung benötigen, um ihren Metabolismus aufrecht zu erhalten.

Fragmentgröße

Eine Voraussetzung, die für das Überleben von Schwammfragmenten essentiell ist besteht darin, dass an jedem Fragment eine bestimmte Menge Pinacoderm und Choanosom verbleibt, um die Regenerationsfähigkeit des Fragments zu erhalten (NICKEL & BRÜMMER 2003, DE CARALT *et al.* 2003). Wird diese Menge von Pinacoderm und Choanosom am Schwammfragmentvolumen unterschritten, werden Mesohylzellen ins Medium freigesetzt und das Fragment würde absterben (DUCKWORTH *et al.* 1997, DUCKWORTH & BATTERSHILL 2003a, b). Dabei hängt die essentielle Menge des zu verbleibenden Pinacoderms und Choanosoms von der Fragmentgröße ab: kleinere Fragmente benötigen einen größeren Anteil an Pinacoderm und Choanosom an der Gesamtfragmentbiomasse als größere Fragmente (OSINGA *et al.* 1999a).

Die Fragmentgröße beeinflusst auch den Transport von Nahrung und Sauerstoff in das Gewebe von Schwammfragmenten. In Schwämmen erfolgt der Massentransfer per diffusiven und konvektiven Transportprozessen durch das aquifere System (OSINGA *et al.* 1999a). In größeren Schwammfragmenten kann es, bedingt durch eine zunehmende Fragmentgröße, zur Limitationen des Massentransports von Nahrung und Sauerstoff in tiefere Gewebeschichten kommen (DUCKWORTH *et al.* 1997, 2003, OSINGA *et al.* 1999a, LE PENNEC *et al.* 2002, 2003, CAMACHO *et al.* 2006a). Dadurch werden diese Stoffe zum limitierenden Faktor, so dass eine adäquate Ernährung und Sauerstoffversorgung eingeschränkt wird (GATTI *et al.* 2002, HOFFMANN *et al.* 2005) und die Wachstumsrate des Fragments abnimmt.

Nach CAMACHO *et al.* (2006b) kann das Volumen eines als sphärisch angenommenen Schwammfragments in zwei Zonen eingeteilt werden: eine proliferierende äußere Zone, in der keine Transportlimitation auftritt und in der die Biomasse mit maximaler Wachstumsrate zunimmt, und eine innere Zone, in der die Limitation eines Nahrungsbestandteils einen Level erreicht, der nur für die Erhaltung der metabolischen Funktion ausreicht. Ab welcher Fragmentgröße die Wachstumsrate beeinträchtigt wird, ist bislang unklar (OSINGA *et al.* 1999a). Ungeklärt ist auch die Frage nach der minimalen Größe, die ein Schwammfragment haben muss, um ein Überleben des Fragments gewährleisten zu können.

Licht

Schwämme besiedeln Habitate, deren Lichtexpositionsgrad von stark exponiert bis sehr schattig reicht (HOOPER & VAN SOEST 2002). Der überwiegende Teil aller Schwammarten gedeiht jedoch besser im Halbschatten, als an stark lichtexponierten Standorten (WILKINSON & FAY 1979, WILKINSON & VACELET 1979). Der Grad der Lichtexposition hat dabei nicht nur Bedeutung für den Schwamm, sondern auch für die schwammassoziierten Mikroorganismen (BEER & ILAN 1998, BELARBI *et al.* 2003). Einige Schwammarten, z.B. *A. aerophoba* (3.1.3.1), sind bedingt durch die Limitation der vergesellschafteten, photosynthetisch aktiven Mikroorganismen (2.1) an lichtexponierte Standorte, vorwiegend in (stark) photischen Habitaten verbreitet (HOOPER & VAN SOEST 2002). Die assoziierten photosynthetisch aktiven Mikroorganismen profitieren von der starken Lichtexposition und dienen dem Schwamm als Schutz vor zu starker Lichteinstrahlung, sowie als Nahrungsquelle (SARÁ 1971, MALDONADO & YOUNG 1998, OSINGA *et al.* 1999a). Die Schwämme können sich direkt durch Phagocytose von den Mikroorganismen, bzw. indirekt von den von ihnen produzierten Substanzen, z.B. Glycogen oder Glycerol ernähren (WILKINSON 1979, 1983, WILKINSON & FAY 1979, ARILLO *et al.* 1993, ALBERTS *et al.* 2005). Schwammarten mit einer hohen Abundanz assoziierter, photosynthetisch aktiver Mikroorganismen müssen daher weniger partikuläre Nahrung aus dem umgebenden Wasser aufnehmen, als Arten mit einem geringem Spektrum assoziierter Mikroorganismen (WILKINSON & VACELET 1979, BELARBI *et al.* 2003).

Die Netzprimärproduktion der Schwämme und die Photosyntheserate der Mikroorganismen z.B. Cyanobakterien, ist abhängig von der Lichtintensität (SOMMER 1998). Bei zu niedriger Lichteinstrahlung kommt es zur Lichtlimitation der Mikroorganismen, so dass die Photosyntheserate gering ist und die Abundanz sinkt (SOMMER 1998). Sie steigt im linearen Verhältnis mit zunehmender Lichtintensität an und erreicht ein Sättigungsniveau, bei dem die Photosyntheserate der Mikroorganismen maximal ist. Bei einer Steigerung über den Sättigungsgrad hinaus, käme es zur Lichthemmung und die assoziierten Mikroorganismen, speziell von (semi-)kryptischen bzw. kryptischen Schwammarten, z.B. *S. domuncula* (3.1.3.3) könnten absterben, wodurch sie nicht mehr als Lichtschutz und als Nahrungsquelle zur Verfügung stünden. Das Schwammgewebe würde durch die direkte Lichteinstrahlung geschädigt werden und absterben, oder durch den Nahrungsmangel würde eine Reduktion der Vitalität des Schwammes resultieren (ARNDT 1933, WILKINSON & FAY 1979, WILKINSON & VACELET 1979).

2.3.2.2 Ernährung von Schwammfragmenten

Partikuläre Nahrung

Die Konzentration des im Meerwasser vorkommenden organischen Kohlenstoffs liegt durchschnittlich bei $\sim 1 \text{ mg l}^{-1}$. Dabei wird der organische Kohlenstoff (Total Organic Carbon, TOC) in gelösten organischen Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon, DOC) und partikulären organischen Kohlenstoff (Particular Organic Carbon, POC) unterteilt (RIBES *et al.* 1999a, b, CAMACHO *et al.* 2006a). Schwämme sind in der Lage sich von beiden Kohlenstofffraktionen (POC und DOC) zu ernähren, allerdings wird von den meisten Schwämmen hauptsächlich POC und partikuläres, organisches Material (POM) verwertet (RIBES *et al.* 1999a, b). Wenn im natürlichen Habitat der Schwämme Nahrung als permanent verfügbar anzusehen ist, wobei im Wasser eine sehr diverse Mischung verschiedenster Nahrungsorganismen enthalten ist, stellt die adäquate Nahrungsversorgung das Hauptproblem der *ex-situ* Kultivierung dar (OSINGA *et al.* 1998). OSINGA *et al.* (1998) zeigen, dass eine adäquate Futtermittelverfügbarkeit der Schlüssel für den Erfolg einer *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen ist. Erfolgt keine ausreichende Versorgung mit partikulärer Nahrung, kommt es zum Absterben der Schwämme durch Verhungern.

Dabei sind zwei Fragen für den Erfolg einer *ex-situ* Schwammkultur von größter Wichtigkeit: (A) welche Nahrungsorganismen sind für die Kultivierung einsetzbar bzw. werden von den kultivierten Schwämme als Nahrung aufgenommen und (B) wie viel Nahrung sollte zudosiert werden, um eine ausreichende Ernährung der Schwämme zu gewährleisten. Daten darüber, welche Menge und Zusammensetzung an Nahrung Schwämme für ihren Erhaltungsstoffwechsel bzw. für (maximales) Wachstum benötigen, sind kaum vorhanden (REISWIG 1971, 1975a, PILE *et al.* 1996, 1997, OSINGA *et al.* 1999a, RÜHLE *et al.*, übermittelt).

In Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen wurden Bakterien und Phytoplankton, z.B. *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., lyophilisierte *E. coli*, *Porphyridium* sp., *Nannochloropsis* sp. oder *Rhodomonas* sp. zur Ernährung von Schwämmen verwendet (OSINGA *et al.* 2001, 2003, MILANESE *et al.* 2003). Diese wurden in Konzentrationen von $10^4 - 10^8$ Zellen ml^{-1} als Einzelzugabe oder gepulst zudosiert, ergaben aber bisher nicht die gewünschten Ergebnisse in Bezug auf die angestrebten Schwammwachstumsraten (REISWIG 1971, FRANCIS 1982, RIISGÅRD 1993, OSINGA *et al.* 1997 und 1999a, b).

Eine deutliche Erhöhung der Nahrungspartikel [ml^{-1}], um die Fragmente mit ausreichend Nahrung zu versorgen, kann negative Auswirkungen auf die Schwämme haben. OSINGA *et al.* (1999a, 2001) zeigen, dass eine massive Steigerung der Zellzahl pro Milliliter je nach Partikelgröße zu einer Blockade der einführenden Kanäle des aquiferen Systems und der Choanocytenkammern führen kann. Dadurch kann es zu einer starken Abnahme der Filtrationsrate kommen, so dass Schwämme durch die Nahrung inhibiert werden und verhungern (Abb. G 6).

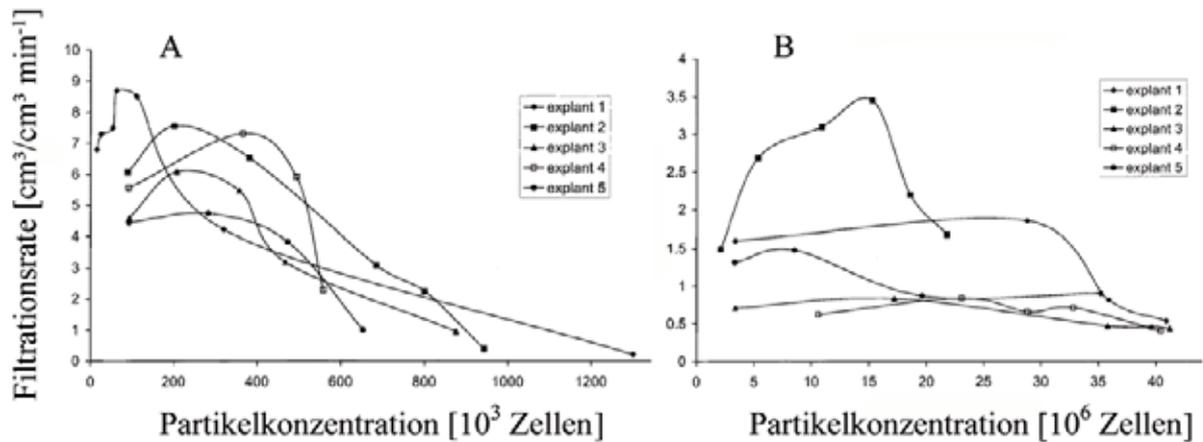


Abb. G 6: Darstellung des Zusammenhangs der Partikelkonzentration im Wasser und der Partikelfiltrationsrate von *Pseudosuberites andrewsii* für die Futterorganismen (A) *Dunaliella tertiolecta* und (B) *Synechococcus* sp. (nach: OSINGA *et al.* 2001, verändert).

Gelöste Substanzen

Die Ernährung von Schwammfragmenten mit gelöster Nahrung hat im Gegensatz zur Verwendung von partikulärer Nahrung einen entscheidenden Vorteil: Auch in sehr hohen Dosen verwendet, kann das aquifere System und die Choanocytenkammern nicht blockiert werden. Wenn kultivierte Schwammfragmente nicht zusätzlich mit partikulären Futterorganismen versorgt werden, ist nach CAMACHO *et al.* (2006a, b) das zu beobachtende Wachstum der Fragmente auf die Aufnahme von DOC und anderen Nahrungsbestandteilen aus dem Medium zurückzuführen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Untersuchungen durchgeführt, Porifera, Bivalvia, Echinodermata oder Crustacea in kommerziellen Zell-Medien, z.B. DMEM, RPMI, M199, L-15 angereichert mit Wachstums promotoren in *in-vitro* Kulturen zu kultivieren (DE ROSA *et al.* 2001, 2003, ZHAO *et al.* 2005, CAMACHO *et al.* 2006a).

Beispielsweise wurden in verschiedenen Versuchen epitheliale Wachstumsfaktoren, Retinsäure oder Hühner-Embryoextrakt verwendet, um Urochordata zu ernähren, die jedoch scheiterten (CAMACHO *et al.* 2006a). Ein Grund für das Scheitern könnte darin begründet sein, dass die verwendeten Wachstumspromotoren aus „terrestrischen Quellen“ gewonnen wurden, die in ihrer Zusammensetzung nicht den metabolischen Bedürfnissen mariner Tiere entsprechen. Eine denkbare Alternative für den Einsatz „terrestrischer“ Wachstumspromotoren wäre die Verwendung von Medien, angereichert mit Extrakten aus marinen Organismen, wie sie von CAMACHO *et al.* (2006a, b) verwendet wurden. CAMACHO *et al.* (2006a, b) beschreibt dabei, dass Extrakte aus marinen Tieren von Schwämmen besser aufgenommen und verwertet werden müssten.

Neben den Bemühungen eine Ernährung von Schwammfragmenten mit partikulärer Nahrung oder Komplexmedien, angereichert mit Aminosäuren und Extrakten aus marinen Tieren zu bewerkstelligen, sollte durch den Zusatz verschiedener Substanzen, z.B. Si- und Fe³⁺-Ionen garantiert werden, dass die Schwämme mit dem verwendeten Kulturmedien möglichst alle relevanten Nahrungsbestandteile erhalten (3.2.1.10). Si- und Fe³⁺-Ionen sind für die Zellproliferation und Spiculabildung bei Demospongiae von essentieller Bedeutung und stellen limitierende Faktoren für das Wachstum von Schwämmen dar (ROTHENBERGER 2005, SCHRÖDER *et al.* 2003, LE PENNEC 2003). Neben der Verwendung von Si- und Fe³⁺-Ionen wurden weitere gelöste Substanzen eingesetzt, z.B. Ethanol, Hefeextrakt oder Pepton, um die Ernährung der Schwammfragmente zu gewährleisten, bzw. um einen Effekt dieser Substanzen auf das Wachstum der Schwammfragmente zu untersuchen (Tab. M 2).

Von BINDER (2007) wurde die Synthese von Alkoholdehydrogenasen in Schwämmen nachgewiesen. Alkoholdehydrogenasen haben eine breite Substratvielfalt und können Ethanol für den Schwammmetabolismus verfügbar machen, so dass es als Energiequelle dienen kann. Möglicherweise wird das Ethanol dabei nicht vom Schwamm, sondern von schwammassoziierten Mikroorganismen aufgenommen. Durch die bakterielle Aufnahme und Verwertung des Ethanols käme es zu einer starken Zunahme der Mikroorganismen, die vom Schwamm als Nahrungsquelle genutzt werden könnten. Dadurch könnte es zu einem gesteigerten Wachstum der Schwammfragmente kommen. Aus der Aquaristik ist außerdem bekannt, dass die Zugabe von Ethanol bei niederen Tieren, z.B. Anthozoa, eine stärker ausgeprägte Färbung und eine Erhöhung der Vitalität bewirkt (SCHUMACHER, pers. Mitteilg.). Ähnliche Effekte könnten auch bei Schwämmen auftreten.

2.3.3 Multizelluläre Reaggregate

Im Zuge der Versuche Schwämme in Aquakultur zu züchten (PRONZATO *et al.* 1999, DUCKWORTH *et al.* 1999) wurden Methoden zur biotechnologischen Kultivierung von Einzelzell- und Monolayer-Schwammzellkulturen entwickelt (POMPONI & WILLOUGHBY 1994, RINKEVICH & BLISTO 1998). Die Idee hinter diesen Versuchen war, Kulturen aus dissoziierten Zellen, ähnlich den zweidimensionalen Kulturen von Säugerzellen zu erschaffen, die genutzt werden um verschiedene *in-vivo* Vorgänge, bspw. die Invasion maligner Zellen in nicht malignes Gewebe *in-vitro* simulieren zu können (BRÄUNER 1987, MÜLLER-KLIESER 1997). Für die Etablierung von kontinuierlich proliferierenden Einzelzellkulturen bzw. Zelllinien werden Stammzellen benötigt, welche die Fähigkeit besitzen sich in jede andere Zellform differenzieren zu können (RINKEVICH 1999, DE CARALT *et al.* 2007), die in Schwämmen in Form der Archaeocyten vorliegen (Abb. G 3). Aufgrund der hohen Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde vermutet, dass es relativ einfach sein müsste, derartige Zellkulturen bzw. Zelllinien herzustellen (DE ROSA *et al.* 2003). Versuche Zelllinien aus Einzelzellen herzustellen erwiesen sich bislang aber als äußerst schwierig (POMPONI & WILLOUGHBY 1994, ILAN *et al.* 1996, CUSTODIO *et al.* 1998, RINKEVICH & BLISTO 1998, LEININGER 2000, SIPKEMA *et al.* 2003a, b, 2004, POMPONI 2006). Die Zellteilungsrate der Schwammzellen nach der Dissoziation und der Reaggregation zu einem zweidimensionalen Zellverband ist äußerst gering (CUSTODIO *et al.* 1998, MÜLLER *et al.* 1999).

Von dissoziierten, zweidimensional wachsenden Schwammzellen wird keine DNA mehr repliziert und sie verlieren ihre Telomeraseaktivität (FRESHNEY 2000). Eine Änderung dieses Zustands konnte durch die Zugabe von Nahrung oder verschiedenen Substanzen nicht stimuliert werden (POMPONI & WILLOUGHBY 1994). Die vollständige Zellfunktionalität erfordert eine chemische Kommunikation, d.h. die Zellen müssen untereinander zur Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion fähig sein, anderenfalls bleiben die Stimuli zur Proliferation aus (KOZIOL *et al.* 1998, MÜLLER *et al.* 1999).

Von CUSTODIO *et al.* (1998), MÜLLER *et al.* (1999, 2004b, c) oder MÜLLER & CUSTODIO (2000) wurde angenommen, dass dissoziierte Schwammzellen im dreidimensionalen Gewebe die uneingeschränkte Fähigkeit zur Proliferation haben müssten. Deshalb wurde als Weiterentwicklung der zweidimensionalen Zellkulturtechnik die Kultivierung von dreidimensionalen, multizellulären Reaggregationen (MZRA) angestrebt. Zur Gewinnung von Einzelzellen, d.h. zur Dissoziation von Schwammgewebe, wurden verschiedene Methoden beschrieben:

(A) Chemische Dissoziation: durch das Fehlen zweiwertiger Ionen in Kalzium-Magnesium-freiem Seewasser (Calcium-Magnesia-Free-Seawater, CMFSW) verliert der Schwamm seine adhäsive Matrix und zerfällt in Einzelzellen (HUMPHREYS 1962, MÜLLER *et al.* 1978, 1985, KÜHNLE 2003).

(B) Enzymatische Dissoziation: durch den Einsatz von Protease, Trypsin oder Collagenase werden Zellen aus einem Zellverband herausgelöst und vereinzelt (SIMPSON 1984, POMPONI & WILLOUGHBY 1994).

(C) Mechanische Dissoziation: Schwammgewebe wird durch Strukturen, z.B. Siebe, mit sehr geringen Maschenweiten gepresst und Einzelzellen und kleinere Gewebefetzen werden aus dem Gewebe gelöst (WILSON 1907, DE ROSA *et al.* 2001, 2002, 2003).

Zwischen dem Reaggregationsverhalten und der Ausbildungsrate von MZRA können, nach LEININGER (2000) und KÜHNLE (2003), abhängig von der angewendeten Dissoziationsmethode große Unterschiede auftreten. Gelegentlich wird daher eine Kombination aus mechanischer und chemischer Dissoziation angewendet, um den osmotischen Stress der chemischen Dissoziation für die Schwammzellen zu minimieren (WILSON 1907, ARNDT 1933, DE ROSA 2003).

Dissoziierte Schwammzellen haben die Fähigkeit, in Anwesenheit von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu reaggregieren und dabei eigene Zellen von fremdem Zellmaterial zu unterscheiden (WILSON 1907, GAINO *et al.* 1999). Es kommt zur Bildung von sphäroiden MZRA. Diese MZRA behalten ihre Telomeraseaktivität (KOZIOL *et al.* 1998, CUSTODIO *et al.* 1998), bzw. erlangen sie nach Reaggregation aus einer Einzelzellsuspension und wiederhergestellter Zellinteraktionsmöglichkeit wieder (CUSTODIO *et al.* 1998). Allerdings ist in MZRA nach NICKEL & BRÜMMER (2003) eine relativ geringe Zell-Teilungsrate zu erwarten.

Multizelluläre Reaggregate stellen möglicherweise den ersten Baustein in einem komplexen System dar, um *in-vitro* Schwammkulturen dauerhaft etablieren zu können. Die Option, Reaggregate von vielen verschiedenen Schwammarten nach Bedarf herzustellen, so dass Probleme mit der Beschaffung von frischen Schwammindividuen und dem Transport entfallen würden, eröffnet neue biotechnologische Perspektiven (ILAN *et al.* 1996, 1998, SIPKEMA *et al.* 2003a, b).

Der Formationsprozess von dissoziierten Schwammzellen zu MZRA könnte als Aufreinigungsschritt dienen, um Pilze, Bakterien und andere schwammassoziierte Organismen, z.B. Thraustochytriden oder eukaryotische, heterotrophe Protisten aus dem Gewebe zu eliminieren (BOROJEVIC 1970, 1971, CUSTODIO *et al.* 1998). Ein erneutes Dissoziieren von MZRA würde zu einer (fast) axenischen Zelllinie führen. Der Beweis, dass die Herstellung und Kultivierung von Reaggregaten zur Produktion von größeren Mengen Schwamm biomasse führen kann, steht aber noch aus (SIPKEMA *et al.* 2003a, b, MÜLLER *et al.* 2004c).

2.3.3.1 Ernährung multizellulärer Reaggregate mit gelösten Substanzen

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden bisher unterschiedliche Medien getestet, z.B. RPMI-Medium angereichert mit fötalem Kälberserum, Dulbecco`s modified Eagle`s Medium, DMEM, angereichert mit Cholesterol, Methyl- β -cyclodextrin, Linol- und Ölsäure, wasserlöslichem Retinol oder Glucose, um MZRA und zweidimensionale Zellkulturen ähnlich wie Säugerzellkulturen in definiertem Medium dauerhaft zu kultivieren (POMPONI & WILLOUGHBY 1994, ILAN *et al.* 1996, ZHANG *et al.* 2004). MÜLLER *et al.* (1981) und POMPONI & WILLOUGHBY (1994) beschreiben, dass die Proliferation zu Beginn der Kultivierung von Zellkulturen durch Zugabe von Phytohemagglutinin (PHA), bzw. Lectin bedingt stimuliert werden kann.

Auch die Anreicherung des verwendeten Kulturmediums mit Eisen-(III)-Ionen und Kieselsäure wird von DE ROSA *et al.* (2003) als Proliferationsstimulus beschrieben. Nur in Gegenwart von Fe^{3+} - und Si-Ionen, werden verschiedene Gene exprimiert bzw. Proteine, z.B. Silicatein, Collagen oder Myotrophin, die für die Bildung der extrazellulären Matrix nötig sind gebildet (SCHRÖDER *et al.* 2003). Eisen ist darüber hinaus für die Bildung von Spicula notwendig (ROTHENBERGER 2005) und steigert die Bildung von Ferritin, Septin und Scavenger Rezeptor-Genen (SCHRÖDER *et al.* 2003).

2.3.4 Gemmulae

Als Möglichkeit ungünstige Lebensbedingungen zu überleben, haben Schwämme eine Überdauerungsform, so genannte Gemmulae entwickelt. Von vielen Süßwasserschwammarten ist bekannt, dass sie im Herbst Gemmulae ausbilden, aber nur wenige marine Schwammarten, z.B. *Haliclona* sp., *Cliona* sp. und *Suberites* sp. bilden Gemmulae (MÖHN 1984).

Durch ungünstige Umweltbedingungen induziert, werden vom „Mutterschwamm“ vom Sommer bis in den Spätherbst in großer Anzahl Gemmulae, entweder im oder unter dem lebendem Schwammgewebe gebildet (MÜLLER 1911, BOROJEVIC 1970, 1971). Nach drastischer Gewebsreduktion stirbt der Elternschwamm ab und die Gemmulae werden freigesetzt (STREKAL & MCDIFFETT 1974, HARSHA *et al.* 1983, LANGENBRUCH 2004). Die Gemmulae keimen entweder direkt auf der Unterlage, auf der sie fixiert sind wieder zum Jungschwamm aus, z.B. *Spongilla* sp. und *Ephydatia* sp., oder werden verdriftet und verbreiten auf diesem Weg die Art. Dabei kann aus jeder Gemmula ein neuer Schwamm entstehen (LANGENBRUCH 2004, SCHILL *et al.* 2006).

Ein Gemmula besteht aus einer kompakten Masse großer, undifferenzierter, granuloser Zellen, eingeschlossen in eine kollagene Hülle, die mit Microskleren und Spicula als Fraßschutz und zur Stabilisierung ausgestattet ist (Abb. G 6) (WEISSENFELS 1978, WEISSENFELS & LANDSCHORFF 1977, FELL 1974, WEISSENFELS 1989). Der Durchmesser einer Gemmula beträgt ungefähr 20 µm. Die Gemmulahülle kann ein- bis dreischichtig aufgebaut sein (PRONZATO & MANCONI 2001, LANGENBRUCH 2004) und besteht hauptsächlich aus Spongin und SiO₂-Gemmuloskleren (SCHILL *et al.* 2006).

Zwei physiologische Zustände, in denen Gemmulae (zeitweise) nicht keimen, sind bekannt: Keimruhe (konsekutive Dormanz) und Diapause (prospektive Dormanz). Die konsekutive Dormanz ist ein inaktiver Zustand, der zeitlich begrenzt andauert, um unvorteilhafte Umweltbedingungen zu überdauern (BOUTSELIS *et al.* 1990). Sobald die Bedingungen wieder im optimalen Bereich liegen, keimen die Gemmulae aus und bilden einen Jungschwamm. Im Gegensatz dazu ist die prospektive Dormanz ein inaktiver Zustand, der genetisch beeinflusst ist und häufig in der Entwicklung des Organismus so gelegen ist, dass die Entwicklungshemmung einsetzt, ehe eine meist saisonale, ungünstige Veränderung eines abiotischen Faktors erfolgt (FELL 1992).

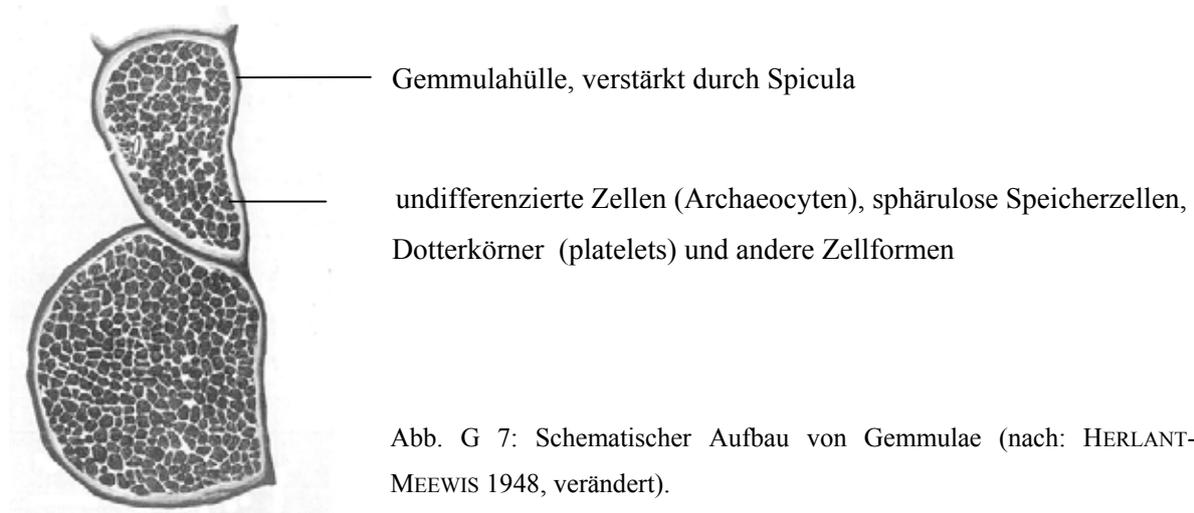


Abb. G 7: Schematischer Aufbau von Gemmulae (nach: HERLANT-MEEWIS 1948, verändert).

Der Beginn der prospektiven Dormanz ist häufig an ein bestimmtes Entwicklungsstadium des Organismus gekoppelt und der auslösende Faktor kann z.B. die Photoperiode (Tageslichtlänge) sein. Es ist äußerst schwierig den jeweiligen Dormanzzustand von Gemmulae eindeutig zu determinieren. Zeitgleich können Gemmulae des einen oder anderem Zustands ausgebildet werden und die Bildung von Mischformen aus beiden Zuständen ist denkbar (WELLS *et al.* 1964, SCHILL *et al.* 2006).

Im ersten Entwicklungsschritt auskeimender Gemmulae wird von den keimenden Zellen ein Pinacoderm gebildet, um eine Begrenzung zur Umwelt hin zu formieren. Anschließend organisiert sich das innere Gewebe, ein aquiferes System wird gebildet und es kommt zur Formation eines Jungschwamms (ANKEL & EIGENBRODT 1950, CONNES 1977, 1978). Pinacocyten, die sich aus den undifferenzierten Zellen in den Gemmulae entwickeln, üben einen Zwang gegen das Abkugeln des Jungschwamms aus. Es kommt zum planarem Ausbreiten von Zellen über die Oberfläche nach allen Seiten, um sich am Untergrund festzuheften. Der sich entwickelnde Schwammkörper erhebt sich kegelförmig über der annähernd kreisrunden Anheftungsfläche. Auf der Spitze des Kegels entsteht ein relativ großes Osculum (Abb. G 8), mit einer zur Unterlage ungefähr senkrecht stehenden Achse (ANKEL & EIGENBRODT 1950, CONNES 1977, 1978). Gemmulae haben während der Keimung keine gravimetrische Orientierung, d.h. sie sind nicht an ein räumliches „Oben“ oder „Unten“ gebunden und keimen auch über Kopf aus (ANKEL & EIGENBRODT 1950). Alle Keimungsprozesse erfolgen ohne Nahrungsaufnahme, indem Reservestoffe verwertet werden (Abb. G 7), die in der Gemmula gespeichert vorliegen, um über einen Zeitraum von bis zu 14 Wochen davon zu zehren und sich zu einem Jungschwamm zu formieren (WEISSENFELS 1989). Erst nach dem vollständigen Verbrauch der Reservestoffe wird aktiv Nahrung aus dem umgebenden Medium aufgenommen (WEISSENFELS & LANGENBRUCH 1985).

Die Aufnahme von Nahrung aus dem umgebenden Medium in gelöster oder partikulärer Form ist aber erst dann effizient möglich, wenn ein aquiferes System ausgebildet worden ist. Ein sich formierendes, primitives, aquiferes System wird erst 10 - 14 Tage nach der Keimung gebildet, ein Osculum noch deutlich später (WEISSENFELS & LANGENBRUCH 1985). Erst in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien nehmen die wasserzu- und ableitenden Wege innerhalb von Jungschwämmen Kanalform an und sind zum effizienten Wasser- und Nahrungstransport fähig (ANKEL & EIGENBRODT 1950).

2.3.4.1 Auskeimversuche mit *S. domuncula* - Gemmulae

ANKEL & EIGENBRODT (1950), ließen in ihren Versuchen Gemmulae von *Spongilla lacustris* und *Ephydatia fluviatilis* unter Glasträgern auskeimen (Abb. G 8). Das keimende Schwammgewebe drang zwischen Deckglas und Objektträger vor, heftete sich an beiden Seiten fest und bildete einen flächig wachsenden Jungschwamm aus. Welche Faktoren für das Auskeimen verantwortlich waren und wie die Auskeimung beeinflusst werden könnte, wurde nicht oder nur sehr marginal untersucht.

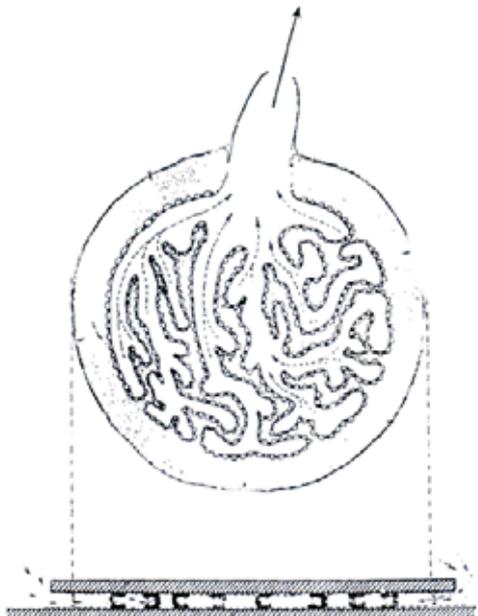
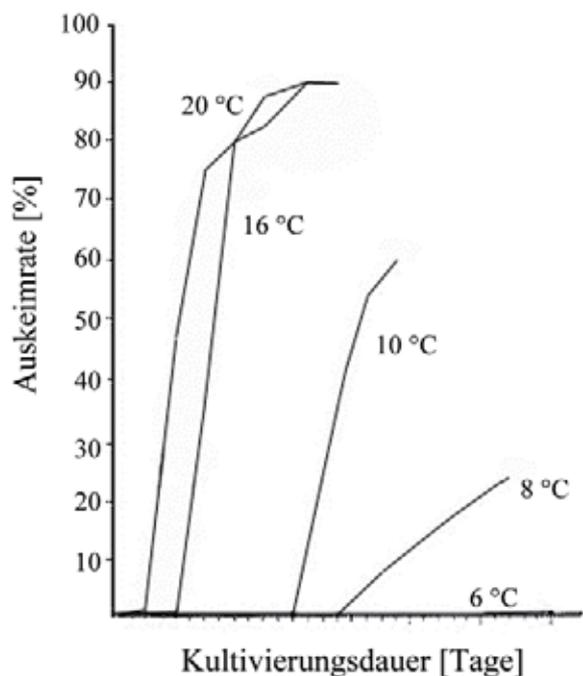


Abb. G 8: Schema eines aus Gemmulae gekeimten Jungschwammes, gewachsen unter Deckglas (Gemmulae unter Deckglas unten im Bild, Jungschwamm im Querschnitt vergrößert dargestellt oben). Der Subdermalraum und die einführenden Kanäle sind punktiert dargestellt, Nahrungspartikel werden in den angedeuteten Choanocytenkammern aus dem Wasser filtriert. Pfeile geben die Strömungsrichtung des Wassers durch das aquifere System des Schwamms ins Atrium und Osculum an. (nach: ANKEL & EIGENBRODT 1950, verändert).

Daher war ein Ziel der durchgeführten Versuche festzustellen, ob Gemmulae der marinen Schwammart *Suberites domuncula* (3.1.3.3) unter *ex-situ* Bedingungen auskeimen und sich zu Jungschwämmen ausbilden und inwieweit die Auskeimrate von Gemmulae und die weitere Entwicklung zu Jungschwämmen von Faktoren, z.B. der Wassertemperatur, dem verwendeten Kulturmedium oder partikulärer Nahrung, abhängig ist und beeinflusst werden kann.

Einfluss der Temperatur auf die Auskeimung

Die Auskeimung von Gemmulae wird stark durch die Wassertemperatur beeinflusst (Abb. M 9) (STREKAL & MCDIFFETT 1974, HARSHA *et al.* 1983) und kann durch die Einwirkung niedriger Temperaturen bedingt stratifiziert werden. Der Begriff Stratifikation wurde aus der Botanik entlehnt und bezeichnet das Behandeln von Samen mit verschiedenen Methoden, z.B. der Einwirkung eines Frostimpulses, um keimungshemmende Substanzen abzubauen und die Auskeimung künstlich anzuregen. Fast alle Samen haben unmittelbar nach ihrer Reife eine Keimruhephase, die überwunden werden muss, bevor die Auskeimung erfolgen kann. Bei Schwämmen dient die Keimruhe der Gemmulae vermutlich dazu, dass Auskeimen im Gewebe des Mutterschwammes zu verhindern. Häufig müssen bestimmte Umweltbedingungen erfüllt sein, bevor Gemmulae auskeimen können. Beispielsweise ist es denkbar,



dass zunächst über einen längeren Zeitraum eine Kälteperiode auf die Gemmulae einwirken muss, bevor eine Keimung einsetzt (HARSHA *et al.* 1983). Dabei scheint die Dauer des Kälteimpulses die Auskeimungsrate stark zu beeinflussen (Abb. G 9) (FELL 1995). So wird die Keimung in ungünstigen Perioden, z.B. in der Zeit vor Winteranbruch, bzw. bei niedrigen Wassertemperaturen eingeschränkt oder vollständig verhindert.

Abb. G 9: Auskeimrate von *Spongilla fragilis* in Abhängigkeit von der Wassertemperatur. (nach: STREKAL & MCDIFFETT, 1974, verändert).

Durch eine Erhöhung der Kultivierungs-Wassertemperatur, nach Einwirkung eines Kälteimpulses, kann die Keimung der Gemmulae von kaltstenothermen Arten anfänglich gesteigert werden (Abb. G 10), wird aber ab einem scheinbar artspezifischen Schwellenwert inhibiert (JETTON *et al.* 1987, FELL 1987, LANGENBRUCH 2004).

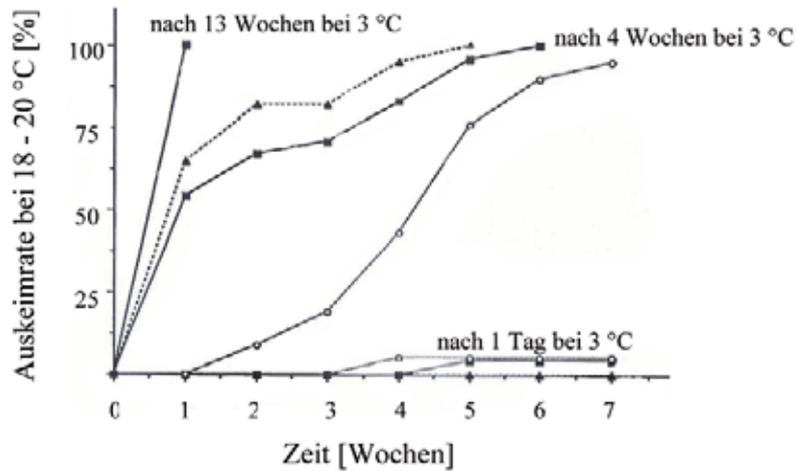


Abb. G 10: Auskeimrate von Gemmulae in Abhängigkeit von der Dauer des Kälteimpulses. (nach: FELL 1995, verändert).

Hohe Wassertemperaturen sind für die Keimung von Gemmulae einiger Schwammarten optimal, z.B. 30 °C für *Spongilla alba* (HARSHA *et al.* 1983), kommen in marinen Bereichen aber häufig nur in Flachwasserzonen vor (SOMMER 1998). Allerdings sind derart hohe Wassertemperaturen von >> 20 - 34 °C für auskeimendes Zellmaterial aus Gemmulae bzw. für *S. domuncula*-Jungschwämme (Abb. G 11) und viele andere Schwammarten letal (HERLANT-MEEWIS 1948, FELL 1974, SIPKEMA *et al.* 2004), so dass die freigesetzten Zellen nach der Auskeimung sehr schnell wieder absterben würden bzw. es nicht zur Bildung von Jungschwämmen kommt.

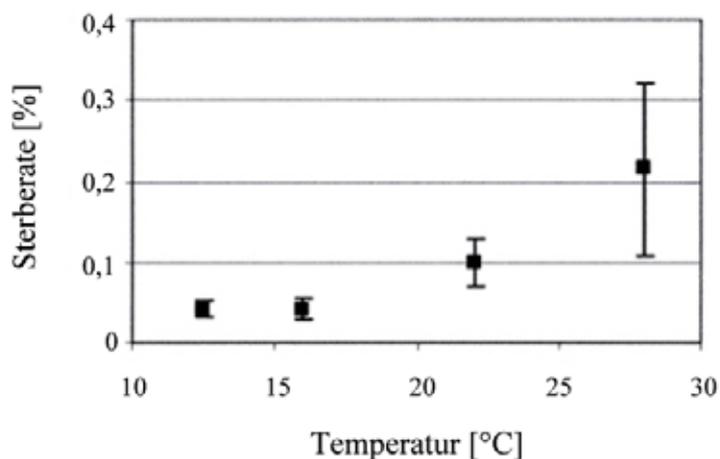


Abb. G 11: Sterberate von *S. domuncula*-Zellen in Abhängigkeit von der Wassertemperatur. (nach: SIPKEMA *et al.* 2004, verändert).

Einfluss von Licht auf die Auskeimung

Gleichlautend beschreiben STREKAL & MCDIFFETT (1974) und OSINGA *et al.* (1999a), dass Licht möglicherweise keinen Einfluss auf die Auskeimung von Gemmulae hat. PENNEY (1954) beschreibt, dass Licht lediglich auf symbiontische Algen Auswirkungen hat, die das Wachstum auskeimender Gemmulae zu Jungschwämmen unterstützen, nicht aber auf die keimenden Gemmulae selbst. Gemmulae die im Halbschatten oder zumindest zeitweise in Dunkelheit inkubiert wurden keimen zwar aus, allerdings kommt es nicht zur Bildung von Jungschwämmen. Vollständige Dunkelheit oder starke Lichteinstrahlung inhibieren die Bildung und möglicherweise auch die Auskeimung von Gemmulae (RASMONT 1970).

2.3.5 Immobilisierung von Schwammzellen

2.3.5.1 Grundlagen der Immobilisierung

Eine weitere untersuchte Kultivierungsmethode war die Immobilisierung von Schwammzellen (WIJFFELS 2001). In einem Immobilisierungsprozess werden Substanzen oder Zellen in einer Trägermatrix eingeschlossen und dadurch in ihrer freien Bewegung oder Diffusion eingeschränkt (BOHLMANN *et al.* 2002). Die entstehenden Immobilisate sind aufgrund ihrer Kugelform und den damit verbundenen, günstigen hydrodynamischen Eigenschaften sehr gut für einen Einsatz in Bioreaktoren geeignet, auch deshalb weil die Kugeln sehr beständig gegenüber mechanischem Abrieb sind (HÜBNER 1998). Üblicherweise werden die erzeugten Immobilisate nach ihrem Aufbau in drei Kategorien unterschieden: Vollkugeln, ummantelte Vollkugeln und Hohlkugeln (HARTMEIER 1986, HÜBNER 1998). Im Folgenden sollen kurz die Vor- und Nachteile des unterschiedlichen Aufbaus aufgezeigt werden, wobei hier nur auf Vollkugeln (ohne Ummantelung) und Hohlkugeln eingegangen wird.

Vollkugeln

Es gibt mehrere Möglichkeiten Vollkugeln herzustellen: einerseits können Tropfen einer kaltgelierenden Substanz unter ihren Schmelzpunkt abgekühlt werden, wodurch ein stabiles Cryogel entsteht, das durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Daneben können Polymere in einer chemischen Reaktion, z.B. mit Glutaraldehyd kovalent vernetzt werden, oder sich über möglicherweise vorhandene Carboxylgruppen und Ca^{2+} -Ionen miteinander verbinden. Auch in diesem Fall entsteht aus wasserlöslichen Polymeren ein stabiles Hydrogel. Beide Prozesse können miteinander kombiniert werden, um die Stabilität der Immobilisate zu steigern. Die Immobilisierung kann dabei prinzipiell in einem Arbeitsschritt bewerkstelligt werden. Das gebräuchlichste Matrixmaterial für eine Immobilisierung ist Alginat, z.B. Na-Alginat (NA), das mit Ca^{2+} - oder anderen polyvalenten Metallionen quervernetzt wird. Hierbei wird von „Iontroper Gelbildung“ gesprochen (HARTMEIER 1986, SPIEKERMANN *et al.* 1987).

Hohlkugeln

Auch diese spezielle Form der Immobilisierung kann in einem Arbeitsschritt hergestellt werden. Dazu werden zwei membranbildende Materialien verwendet, die sich aufgrund von Diffusionslimitierung nicht vollständig gegenseitig durchdringen können. Eine Polymerlösung, z.B. Cellulosesulfat (CS), wird in ein Fällbad vertropft und die Vernetzungsreaktionen laufen nur nahe der Kontaktfläche ab, wodurch sich an der Oberfläche des Tropfens eine stabile Membran um einen flüssigen Kern bildet. Gängige Tropflösungen zur Immobilisierung von Zellmaterial und der Herstellung von CS-Hohlkugeln sind Poly-diallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC), Polyethylenimin (PEI), Poly-methyl-Co-Guanidin (PMCG) oder Alginat + Poly-L-Lysin (PLL) (ORIVE *et al.* 2003). Neben der direkten Herstellung von Hohlkugeln kann diese Immobilisierungsform auch durch die Umkehrung des Herstellungsprozesses für Vollkugeln gewonnen werden, indem der innere Kern der Vollkugel wieder aufgelöst wird.

Grundlage beider Formen der Immobilisierung ist die Bildung eines Tropfens, aus dem durch Gelierung im Fällbad (oder einer anderen Art der Membranbildung) und anschließende Vernetzungsreaktion eine Mikrokapsel entsteht. Die Tropfen können durch Extrusion aus kleinen Öffnungen oder Kapillaren, bspw. Kanülen o.ä. hergestellt werden. Wichtigste Prozesseigenschaft der Immobilisierung ist die Möglichkeit der einfachen Maßstabsvergrößerung in einen industriellen Prozess. Zudem sind die Einheitlichkeit in Form und Größe der Kapseln, sowie die Einsatzmöglichkeit von vielen verschiedenen Immobilisierungsmaterialien vorteilhaft (HÜBNER 1998).

2.3.5.2 Immobilisierung von Schwammzellen in Natrium-Alginat und Cellulosesulfat

Zwei verschiedene Stoffe wurden als Matrixsubstanz für die zu immobilisierenden Schwammzellsuspension verwendet: Natrium-Alginat (NA) und Cellulosesulfat (CS).

Durch Ca^{2+} -Ionen im Fällbad bildet sich an der Grenzfläche zwischen der NA + Schwammzellen-Tropflösung und der Fällbadlösung sofort bei Kontakt eine Simplexmembran. Während sich der Gelierungsprozess ins Innere des Tropfens fortsetzt, verfestigt sich der Kern der entstehenden Kalzium-Alginat-Immobilisate (KA) erst zum Ende des Verkapselungsprozesses.

Während der Kapselbildung kommt es zu einer auswärtsgerichteten Strömung innerhalb des Tropfens, hervorgerufen durch den Konzentrationsunterschied, der durch die an der Tropfenoberfläche ablaufenden Reaktion entsteht. Durch diese Strömung werden die zu immobilisierenden Zellen nach außen mitgerissen und finden sich dann hauptsächlich in der Kapselperipherie (HÜBNER 1998). Gleichzeitig kommt es zu einer Verringerung des Kapselvolumens aufgrund dessen, dass die Makromoleküle in der Kapsel durch Vernetzung enger zusammenrücken und Wasser ausgepresst wird. Die Kapsel hat nach erfolgter Gelierung im Inneren einen weicheren Kern, umgeben von einer stärker gelierten Zone in der Kanäle und Lücken entstanden sind, so dass Substanzen aus dem Kulturmedium in dem die Immobilisate inkubiert werden, durch Diffusion leicht in die Kapsel eindringen können. Der Vorteil der Immobilisierung mit NA bzw. KA liegt darin, dass es sich um eine kostengünstige und gut erforschte, nicht toxische Matrix handelt, in der das Material immobilisiert wird (HÜBNER 1998). Nachteilig wirken sich die hohe Festigkeit der Kapseln und die ungleiche Polymerverteilung in der Kapsel, in Bezug auf die Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen (z.B. Antikörper o. ä.) aus. Außerdem kann es durch PO_4^{3-} und Citrationen, oder EDTA, im Kulturmedium zum Anschwellen und Auflösen der Kapseln kommen. Besonders bei längerer Inkubationsdauer ist eine ungewünschte Gelauflösung festzustellen, die zur Freisetzung von Zellen ('cell leakage') führen kann (HÜBNER 1998).

CS ist ein wasserlösliches Polymer, das durch Veresterung der Hydroxylgruppen der Cellulose gebildet wird, wobei der azide Halbester in ein neutrales Salz umgesetzt wird (LUKANOFF & DAUTZENBERG 1994). Wird das CS-Polyanion in ein Fällbad vertropft, in dem sich das entsprechende Polykation befindet, kommt es ausgehend von der Tropfenoberfläche zur Bildung einer Simplexmembran um einen flüssigen Kern (FABER 2004, BUCHHOLZ *et al* 2005). Die Gelbildung ist über verschiedene Polykationen möglich, wobei die Wahl auf ein Polykation mit permanent geladener, quartärnärer Aminogruppe, z.B. Polydiallyl-dimethylammoniumchlorid, PDADMAC, oder auf ein tertiäres Amin fallen sollte. Die Membrandicke der entstehenden Kugeln kann dabei über die Verweilzeit im Fällbad beeinflusst werden, die mit fortschreitender Zeit zunimmt. Durch Verweilzeiten der Kugeln von 15 - 20 min im Fällbad, werden normalerweise Membrandicken zwischen 50 und 150 μm erreicht. Als Vorteile der Immobilisierung mit CS, wird die Erzeugung von langzeitstabilen Kugeln mit guten Stofftransporteigenschaften angesehen. Besonders nachteilig ist die Neigung der Kugeln zu ungewollten Agglomerationen und der deutlich höhere Preis des Matrixmaterials, gegenüber Natrium-Alginat.

2.3.5.3 Proliferationsnachweis (BrdU-Assay)

Bei der Immobilisierung von Schwammzellen in NA bzw. CS (2.3.5.2) ergeben sich wichtige, zu klärende Fragen:

- (a) leben die Schwammzellen nach der Immobilisierung noch?
- (b) wenn die Zellen die Immobilisierung überlebt haben, wie lange sind sie dann in der Kultivierung noch am Leben?
- (c) sind es eindeutig Schwammzellen, oder handelt es sich bei den immobilisierten Zellen um eine Kontamination, z.B. mit Thraustochytriden, oder anderen pro- bzw. eukaryotischen Organismen?

Die Bestimmung einer Zellproliferation und damit der Nachweis das immobilisierte Zellen noch am Leben sind, erfolgt normalerweise entweder über die Detektion radioaktiv markierten [³H]-Thymidins, eingefügt in neusynthetisierte DNA (Audiographische), oder durch Szintillationszählung (GRATZNER 1982, MIZOGUCHI & WATANABE 1994). Audiographische Aufnahmen sind sehr zeitaufwendig, Szintillationszählungen sind im Vergleich dazu schneller durchführbar, beide Techniken können aber keine quantitativen Aussagen darüber machen, wie häufig sich die Zellen teilen.

Eine Alternative zur radioaktiven Inkorporation und der Szintillation bietet der Einsatz eines BrdU-Assays. BrdU, (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) ist ein Pyrimidinanalogon, das anstelle von Thymidin in neusynthetisierte DNA integriert wird. Im BrdU-Assay wird die Zellproliferation über einen Immunoassay mit einem primären Antikörper (Anti-BrdU) und einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert ist bewerkstelligt. Durch colourimetrische Messung kann die BrdU-Inkorporation in die neusynthetisierte DNA detektiert werden. Der Test erlaubt eine direkte Schlussfolgerung auf die Proliferationsrate der Zellen, die bei Schwämmen allerdings sehr gering ist (CUSTODIO *et al.* 1998, NICKEL & BRÜMMER 2003).

2.3.5.4 Identitätsnachweis

Aufgrund der ausgeprägten morphologischen Ähnlichkeit von Schwammzellen zu schwammassoziierten Mikroorganismen, z.B. Thraustochytriden oder eukaryotischen, heterotrophen Protisten (KLAUTAU *et al.* 1994, RINKEVICH 1999), ist es äußerst wichtig einen Identitätsnachweis der immobilisierten Zellen zu führen. Anderenfalls besteht die Gefahr, dass nicht Schwammzellen, sondern fälschlicherweise die Kontaminanten kultiviert werden (NICKEL *et al.* 2001).

Um nachzuweisen, dass tatsächlich immobilisierte Schwammzellen kultiviert wurden (2.3.5.3c), soll eine DNA-Extraktion und anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) mit möglichst artspezifischen Primern durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, bekannte, spezifische DNA-Sequenzen eines Organismus aus einem komplexen DNA-Gemisch zu amplifizieren, um diese DNA-Fragmente in hoher Anzahl für weitere Untersuchungen bereitzustellen und um Kontaminationen auszuschließen.

Neben der Verwendung von lebenden Schwammzellen zu Immobilisierung, erfolgt auch eine DNA-Extraktion aus immobilisierten Schwammzellen, die durch 10 minütige Hitzebehandlung (80 °C) abgetötet wurden. Mit dieser Kontrolle soll eine mögliche Abnahme des DNA-Gehalts und damit der Bandenstärke im Agarose-Gel über die Kultivierungsdauer nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

2.4 Methoden zur Wachstums- und Biomassenbestimmung von Schwämmen

Für das Studium, bzw. die Optimierung einer dauerhaften *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen, ist die exakte Bestimmung des Wachstums bzw. der Biomassenzunahme eine essentielle Grundvoraussetzung (OSINGA *et al.* 1999a). Zur Bestimmung des Wachstums ist eine Methode notwendig, mit der auch kleinste Veränderungen detektiert werden können. Diese Methode sollte das Überleben der Schwämme jedoch nicht negativ beeinflussen.

Eine häufig angewendete Methode zur Bestimmung der Biomasse von Schwämmen ist die Volumenbestimmung durch Wasserverdrängung (OSINGA *et al.* 1999a, c). Die Schwammprobe wird vom Kultivierungsbecken in ein geeichtes Messgefäß umgesetzt und das Volumen des Schwammes durch Wasserverdrängung bestimmt. Die Methode ist aber nur bedingt anwendbar, denn durch das Umsetzen könnte Luft ins aquifere System eindringen und zu Embolien führen, so dass der untersuchte Schwamm absterben würde (OSINGA *et al.* 1999a).

Eine weitere Methode ist die Bestimmung des Unterwassergewichts von Schwämmen (OSINGA *et al.* 1999a, c). Allerdings birgt diese Methode die Gefahr, einer Überbestimmung des Schwamm-Unterwassergewichts. Nach einiger Zeit in Kultivierung wird vermutlich nur eine Massenzunahme des auf dem Schwamm oder eines Schwammfragmentträgers auftretenden epibiotischen Aufwuchses gemessen, wodurch das Messergebnis für die Schwammbiomasse verfälscht wird.

Eine Bestimmung der Projektionsfläche von Schwämmen mittels zweidimensionalen Fotos (3.2.1.3) wird von vielen Autoren als verlässliche Methode zur Bestimmung des Wachstums von Schwämmen beschrieben (KILIAN 1952, AYLING 1983, HAUSMANN *et al.* 2006). TURON *et al.* (1998), OSINGA *et al.* (1999c) und DE CARALT *et al.* (2003) gehen davon aus, dass eine Zunahme der Fragmentfläche ein Wachstum der Schwammfragmente und damit eine Biomassenzunahme anzeigt. Allerdings birgt die Vorgehensweise der Biomassenbestimmung anhand von 2D-Fotos ein erhöhtes Risiko einer Über- oder Unterbestimmung des Fragmentvolumens, denn sie ist nach Aussage von OSINGA *et al.* (1999c) gut für „regulär“ geformte Schwammarten z.B. *Tethya* sp. und für enkrustierend wachsende Arten, z.B. *Microciona* sp. (AYLING 1983), aber deutlich geringer für irregulär wachsende Schwammarten geeignet.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probengebiet

Die nördliche Adria im Küstengebiet von Rovinj (Kroatien) hat eine mittlere Tiefe von 20 - 40 m (Abb. M 1). Bis zu einer Tiefe von 15 - 20 m dominieren felsige Hartsubstratflächen mit einzelnen Überhängen und lockeren, sedimentüberdeckten Schutthalden. Unterhalb ist der Untergrund mit Schlick bedeckt (MESSAL 2005). Die Temperatur im Oberflächenwasser liegt im langjährigen Sommermittel bei 18 - 25 °C und kann im Winter auf < 4 °C sinken. In 30 - 35 m Tiefe liegt die Temperatur zwischen 3,2 - 10,5 °C (LOMBARDI *et al.* 2006). Sie erreicht im Hochsommer ca. 15 °C und nur bei lang anhaltender starker Sonneneinstrahlung und Erwärmung des Wassers, sowie stabiler Schichtung des Wasserkörpers, kann die Wassertemperatur auf Werte von ~ 20 °C steigen (JAKLIN, pers. Mitteilung). Die relative Sauerstoffsättigung des Wassers beträgt ganzjährig ~ 100 %. Lediglich im Spätsommer kann sich im Limski Kanal (Abb. M 1) durch die Ausbildung einer Thermokline ein reduzierter Sauerstoffgehalt von 70 % einstellen (BRÜMMER *et al.* 2005). Die Salinität liegt bei ~ 36 - 37, kann aber bedingt durch Süßwassereintrag (Regenwasser), speziell im Limski-Kanal schwanken (PAUL 1970a, b). Die Sedimentfracht des Wassers im Gebiet liegt bei ~ 0,4 mm Jahr⁻¹ (PAUL 1970a, b). Im Limski-Kanal kommt es zu einer erhöhten Eutrophierung des Wassers, durch Nährstoffeintrag aus einer Muschelaquakultur-Anlage.

3.1.1.1 Transport der Schwämme

Alle verwendeten Schwämme (3.1.3) stammen aus dem Gebiet nahe der kroatischen Stadt Rovinj. Sie wurden an sechs Probennahme-Zeitpunkten zwischen April 2005 und August 2007 an verschiedenen Tauchplätzen (San Giovanni - A₁, Figarola - A₂, Banjole - A₃ und im Limski Kanal, L₅ - L₃₇, Abb. M 1) von Tauchern mit autonomen Presslufttauchgerät (PTG) aus Tiefen von 2 - 35 m entnommen.

Sessile Schwammarten (3.1.3) wurden mit Hammer und Meißel aus dem Kalkkarst gebrochen, so dass etwas Bodengrund als Matrix am Schwamm verblieb. Von *Axinella polypoides* (3.1.3.2) wurden lediglich kurze „Äste“ abgeschnitten.

Individuen von *Suberites domuncula* (3.1.3.3) wurden in einem Gebiet südwestlich der Insel Banjole (Tauchplatz A₃, Abb. M 1) (JAKLIN, pers. Mitteilg.) in 30 - 35 m Tiefe gesammelt.

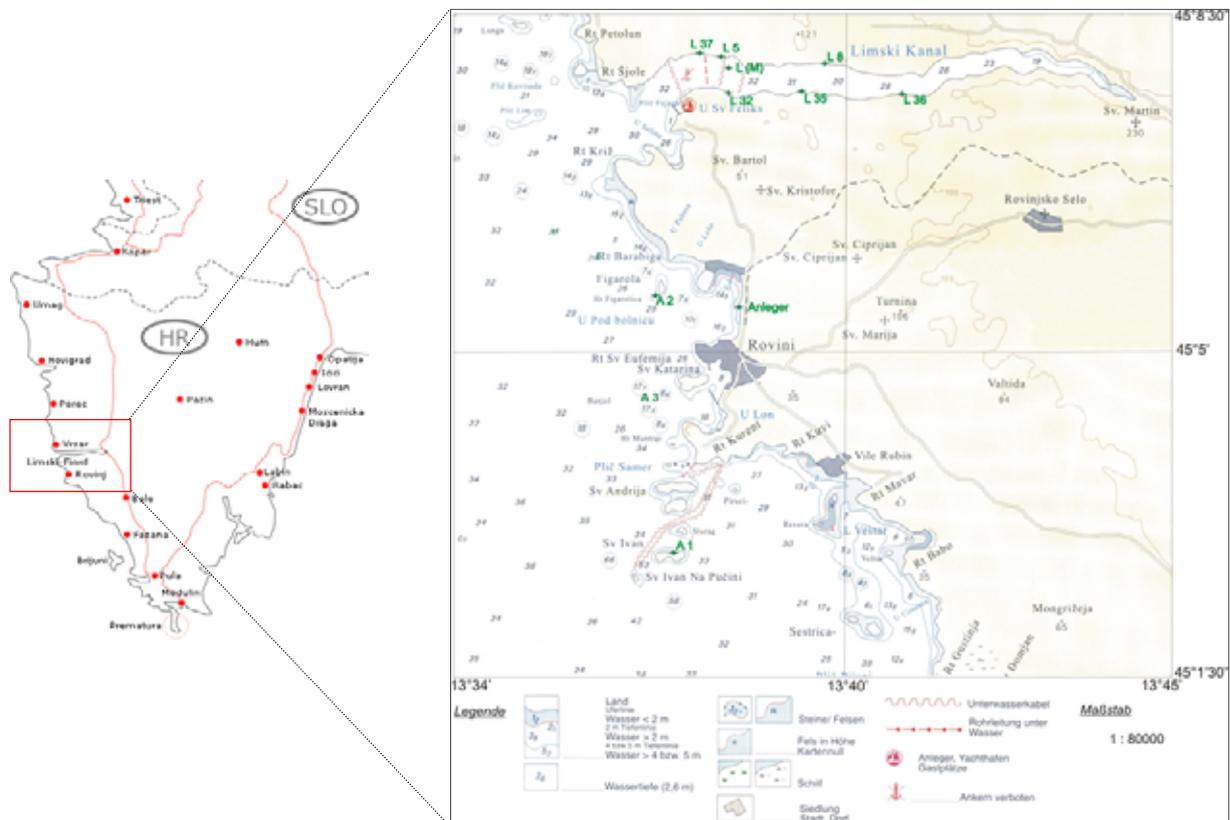


Abb. M 1: Geographische Karte der istrischen Halbinsel, mit Lage des Limski-Kanals (roter Kasten) und des Untersuchungsgebiets nahe der Stadt Rovinj, mit Bathymetrie der einzelnen Tauchplätze: Insel San Giovanni - A₁, Insel Figarola - A₂, Insel Banjole - A₃ und Limski Kanal L₅ - L₃₇. (nach: MESSAL 2005, verändert).

Die entnommenen Schwammproben wurden in Gefäßen gefüllt mit gekühltem Seewasser, zum Meeresbiologischen Institut „Ruđer Bošćović“, Rovinj gebracht und in Aquarien mit permanentem Meerwasserzulauf bis zu ihrem Transport nach Karlsruhe zwischengehärtet. In Karlsruhe wurden die Schwämme für mindestens 24 h an die Wassertemperatur der Kultivierungsbecken (3.1.2) adaptiert und erst danach umgesetzt.

3.1.2. Technischer Aufbau der Kultivierungsbecken

Die gesammelten Schwämme (3.1.1.1) wurden in Karlsruhe auf 8 - 10 Kultivierungsbecken verteilt, die mit den Buchstaben A - J bezeichnet wurden. Kultivierungsbecken A - F, sowie I und J (Abb. M 2) sind in ihrem Aufbau nahezu identisch.

Die Becken bestehen aus einem oberem (Kultivierungs-)Becken, in das die Schwämme eingesetzt wurden und einem unteren Filterbecken, in dem die Wasseraufbereitung erfolgte. Beide Becken sind durch zwei gekoppelte Wasserkreisläufe verbunden, die getrennt voneinander betrieben werden können (Abb. M 2, 9.3). Die Kultivierungsbecken A - E und I - J wurden mit Korallensand und groben Kies etwa 5 - 7 cm hoch gefüllt, wodurch die Ausbildung einer im Sediment lebenden, endobenthischen Gemeinschaft ermöglicht werden sollte, um für die eingesetzten Schwämme naturähnliche Bedingungen zu schaffen. Zur Erzeugung einer Strömung in den Kultivierungsbecken wurde eine Turbelle (Tunze, Penzberg, Typ 6060 bzw. 6080) verwendet, die eine ähnliche Wasserbewegung wie im natürlichen Habitat, von ca. $1,5 \text{ cm sec}^{-1}$, erzeugte (MESSAL 2005).

Ein weiteres Kultivierungsbecken, bezeichnet mit Buchstaben H, wurde als Modulbecken konzipiert und besteht im Gegensatz zu den Becken A - F und I - J (s. o.) nicht aus einem großen Kultivierungsbecken, sondern aus acht oberen, separaten Modulen (Versuchsbecken H₁ - H₈, Abb. M 2) mit acht darunter liegenden, temperatursteuerbarem Versorgungsbecken (9.3). Durch eine Pumpe, Typ 1001.220 (Eheim, Deizisau) wurde Wasser aus den Versorgungsbecken in die Modulbecken gefördert (600 l h^{-1}) und damit eine leichte Strömung in den Einzelbecken erzeugt. Bei Bedarf wurden die Modul- / Versorgungsbeckeneinheit vom Filterbecken-Kreislauf getrennt und Wasser nur zwischen Modulbecken und Versorgungsbecken umgewälzt. Diese Trennung wurde gewählt, um ein Vermischen und Akkumulieren unterschiedlicher, gelöster Substanzen und partikulärer Futterorganismen (3.2.1.10) im Wasser des Filterbeckens und anschließende Verteilung auf alle Einzelbecken zu vermeiden. Alle Kultivierungsbecken wurden mit künstlichem Meerwasser (artificial seawater, ASW, ATKINSON & BINGMAN 1997), das nach dem Anmischen von Salz (Tropic marin Salz, Dr. Biener, Wartenburg) in VE-Wasser mindestens zwei bis drei Tage „altern“ musste gefüllt. Durch wöchentlichen Austausch von 25 - 30 l ASW in jedem Kultivierungsbecken wurden limitierende Makro- und Mikronährstoffe ersetzt. In den Filterbecken (Abb. M 2) wurden leicht abbaubare, organische Substanzen für Bakterien durch einen Biofilter verfügbar gemacht, so dass sie aus dem Wasserkreislauf entfernt wurden. In einem Eiweißabschäumer (Fauna Marin, Holzgerlingen), wurde das Wasser mit $25 - 50 \text{ mg h}^{-1}$ Ozon angereichert (Sander Ozonisatoren, Uetze-Eltze), um Mikroorganismen zu eliminieren. Ein nachgeschalteter UV-C Klärer (Trop Tronic, Lüdenscheid) diente dazu, langkettige Makromoleküle aufzubrechen, so dass sie im Biofilter abgebaut wurden.

Das Wasser im Filterbecken wurde durch einen Kühler (AquaMedic, Bissendorf) abgekühlt bzw. durch einen Heizstab erwärmt und nach vollständiger Aufbereitung wieder in die oberen Kultivierungsbecken gepumpt (AquaBee, Zerst). Der Wasseraustausch in den Kultivierungsbecken betrug 108 - 144 l Tag⁻¹, abhängig von der eingestellten Pumpenförderleistung. Über den Becken wurden Tageslichtstrahler (Gewiss, Wenden) installiert und täglich 10 - 12 h eingeschaltet, um eine naturähnliche Photoperiode zu simulieren.

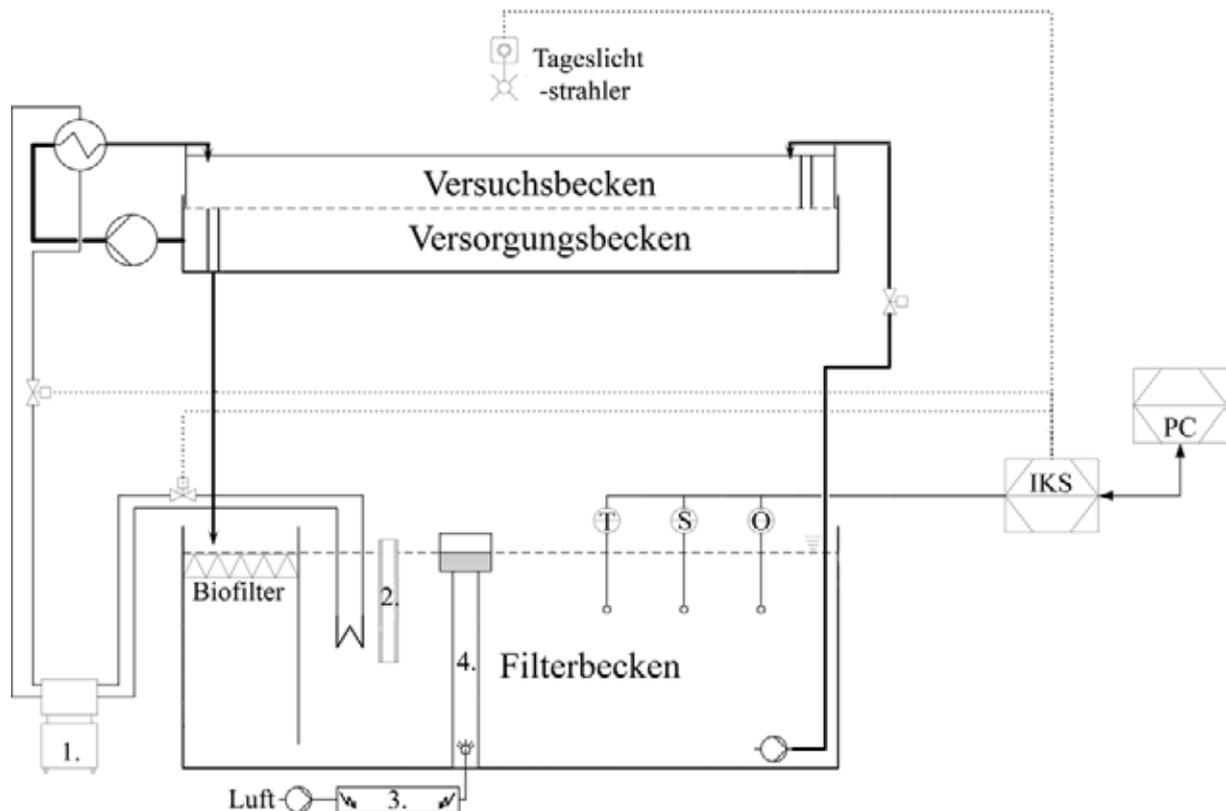


Abb. M 2: Schematischer Aufbau von Kultivierungsbecken H, bestehend aus einer modularen Einheit von acht oberen Modulbecken (H₁ - H₈) und darunter liegenden, temperatursteuerbarem Versorgungsbecken, einem unterem Filterbecken mit Kühler (1.), Heizstab (2.), Ozonisator (3.) und Eiweißabscheider (4.), Zu- und Abläufen, sowie der Kontroll- und Regeltechnik (Meßelektroden für Temperatur (T), Salinität (S), O₂-Gehalt (O)) IKS-Aquariencomputer und PC. Über dem Becken wurde ein Tageslichtstrahler installiert, um eine naturähnliche Photoperiode zu simulieren. (nach: HAUSMANN *et al.* 2006, verändert).

In den Becken A - F und I wurden pH-Wert, Temperatur, Salinität, O₂-Gehalt und der Redoxwert des Wassers permanent durch einen IKS Aquastar[®] Aquariencomputer (IKS, Karlsbad) im oberen Kultivierungsbecken kontrolliert und dokumentiert. In den Becken H und J wurden nur Temperatur, Salinität und Sauerstoffgehalt im Filterbecken gemessen.

Die Parameter-Sollwerte für die Salinität (36,4) und Temperatur (18 °C) in allen Kultivierungsbecken wurden so gewählt, dass sie den Bedingungen im natürlichen Habitat der Schwämme möglichst ähnlich waren (3.1.1). Im Fall einer Toleranzbereichüberschreitung (Salinität: ± 1 mS, Wassertemperatur ± 1 °C) wurde der betreffende Parameter durch den IKS Aquastar[®] automatisch auf Sollwert, z. B. durch Nachdosierung von VE-Wasser bei zu hoher Salinität korrigiert bzw. durch erwärmen oder kühlen auf die entsprechende Temperatur reguliert. Parallel zur automatischen Überwachung, wurde die Wasserqualität manuell durch Merckoquant-Schnelltests (Merck, Darmstadt) für Ca^{2+} und Mg^{2+} , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} und durch manuelle Leitwertmessung mit Salinitätsmesser Knick, Typ 911 Cond (Portamess, Berlin) überwacht.

3.1.3 Modellorganismen

Die verwendeten Schwammarten wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- (a) gute Verfügbarkeit im natürlichen Habitat
- (b) Nachhaltigkeit, d.h. besonders langsam wachsende Arten oder sehr alte Individuen, wurden nicht, oder nur eingeschränkt verwendet
- (c) Existenz von Daten, über die Kultivierbarkeit der jeweiligen Schwammart (2.2.1 - 2.2.2.4)

Folgende Schwammarten wurden verwendet: *Aplysina aerophoba* (Aa), *Axinella polypoides* (Ap), *Chondrilla nucula* (Cn), *Chondrosia reniformes* (Cr), *Suberites domuncula* (Sd), *Suberites massa* (Sm) und *Tethya* sp. In Klammern angegeben sind die für die Arten verwendeten Akronyme. Die vier hauptsächlich verwendeten Schwammarten, *A. aerophoba*, *A. polypoides*, *S. domuncula* und *Suberites massa* werden nachfolgend (3.1.3.1 - 3.1.3.4) kurz vorgestellt.

3.1.3.1 *Aplysina aerophoba*

Ordnung: Verongiida (BERGQUIST 1978)

Familie: Aplysinidae (CARTER 1875)

Gattung *Aplysina* (NARDO 1834)

Art *Aplysina aerophoba* (SCHMIDT 1862)

Massiger, fester, röhren- oder fingerförmiger Körper. Die einzelnen Röhren können 1 - 10 cm hoch und 1 - 3 cm dick ausgebildet sein (Abb. M 3). Jede Röhre mit abgeflachtem Ende, mit apicalem Osculum. Oberfläche mit unregelmäßig verteilten Cornuli, gelb bis bräunlich gefärbt. Verfärbung des Körpers zu dunkelbraun, violett bis schwarz bei längerer Exposition gegenüber Luftsauerstoff. Skelett nur aus einer Faserart mit dichtem gleichmäßigem Mark, das gelegentlich ein hexagonales Netzwerk bildet. Faserdurchmesser 80 - 150 µm, geschichtet, mit dichtem Mark (Ø 30 µm). Photophile Art, auf Felsböden in flachen, lichtdurchfluteten bis tiefen Bereichen (0 - 40 m), als Einzelindividuum oder flächendeckende Kolonien vorkommend.



Abb. M 3: Kolonie von *Aplysina aerophoba*. Gut sichtbar sind die wasserführenden Kanäle, die im Atrium enden, von dem aus das eingestrudelte Wasser durch das Osculum wieder ans umgebende Wasser abgegeben wird. (Foto: A. Jaklin).

Die Art bildet gelegentlich längliche, dünne Auswüchse (Buds) aus, die abreißen und verdriftet werden und somit zur Verbreitung der Art beitragen (HOOPER 1997). Hoher Anteil von Bakterien an der Gesamt-Biomasse von bis zu 40 % (FRIEDRICH *et al.* 1999, THOMS *et al.* 2003). Beschriebene Naturstoffe die aus dieser Schwammart isoliert wurden sind u. a. die bromierten Tyrosinderivate Aerophobin 2, Isostictularin 3, Aplysinamisin 1 und das Pigment Uranidin (EBEL *et al.* 1997, TURON *et al.* 2000, THOMS *et al.* 2003, THOMS 2004, PROKSCH *et al.* 2006)

3.1.3.2 *Axinella polypoides*

Ordnung: Halichondrida / Axinellides (GRAY 1867 / LÉVI 1953)

Familie: Axinellidae (CARTER 1875)

Gattung: *Axinella* (SCHMIDT 1862)

Art: *Axinella polypoides* (ESPER 1794, SCHMIDT 1862)

Aufrechter, verzweigter, mäßig fester bis flexibler Körper, mit unregelmäßig dicken Ästen (Ø 1 - 2 cm, oval). Kann bis zu 1 m hoch wachsen, orange-rot, selten auch gelb gefärbt (Abb. M 4). Samtige, gleichmäßige Oberflächig, kleine Oscula, sternförmig angeordnet. Choanosomales axiales Skelett aus verdichteten Megascleren, außeraxiales Skelett aus dünnen, rechtwinklig vom Kern ausgehenden Fasern, teilweise fiedrig, ectosomale Büschel aus langen Sty-



len (BOURY-ESNAULT & RÜTZLER 1997). Megaskleren: 375 - 450 µm lange Stylen und 220 - 400 µm langen Ozen, jeweils 12 µm Ø. Microskleren: 22 - 25 µm lange Trichodragmata, die über das ganze Skelett verteilt sind. Vorzugsweise an horizontalen Standorten mit gleichmäßiger Strömung, 10 - 100 m tief, auf Fels- oder Siltgrund vorkommend (HOOPER & VAN SOEST 2002, BRÜMMER *et al.* 2003). Aus *Axinella polypoides* wurden verschiedene (Häm)-Agglutinine isoliert (BRETTEING & KABAT 1976).

Abb. M 4: *Axinella polypoides* im Vordergrund, flankiert von Steinkorallen, am Tauchplatz L30 („Axinella-Grund“) im Limski-Kanal, Tiefe ca. 12 - 15 m.

3.1.3.3 *Suberites domuncula*

Ordnung: Hadromerida (TOPSENT 1894)

Familie: Suberitidae (SCHMIDT 1870)

Gattung: *Suberites* (NARDO 1833)

Art: *Suberites domuncula* (OLIVI 1792)

Kompakter, fester Körper, meist kräftig orange gefärbt, jedoch mit breitem bekannten Farbspektrum, das von weiß über gelblich bis blau oder braun reichen kann (Abb. M 5). Glatte Oberfläche, oft mit einem zentralen Osculum, aber auch mehrere kleine Oscula möglich. Meist 1 - 3 cm Körperdurchmesser, gelegentlich bis faustgroß werdend. Skelett: Megaskleren als Tylostyle, im Ectosom senkrecht zur Oberfläche angeordnet und kleiner als im Choanosom (BOURY-ESNAULT & RÜTZLER 1997). Semikryptische bis kryptische Art, auf Sand- und Schlickböden in Tiefen von 30 - 40 m vorkommend (HOOPER & VAN SOEST 2002, BRÜMMER *et al.* 2003). Meist auf Schneckengehäusen (bspw. von *Trunculariopsis trunculus*) wachsend und mit einem Einsiedlerkrebs der Gattung *Paguristis*, die im Schneckengehäuse leben, symbiotisch vergesellschaftet (CARUSO *et al.* 2005). Der Schwamm sorgt durch seine Sekundärmetabolite, z.B. 2'-5'-oligoadenylat, myotrophinähnliche Polypeptide oder Suberitin (KRASKO *et al.* 2000, GREBENJUK *et al.* 2002, MÜLLER 2003, THAKUR *et al.* 2003) für den Schutz des Krebses vor Fressfeinden (CARUSO *et al.* 2005). Der Krebs wiederum transportiert den Schwamm zu neuen Nahrungsquellen, so dass der Schwamm „passiv mobil“ wird und zusätzlich durch die Verwertung von Nahrungsresten des Krebses profitiert (CARUSO *et al.* 2005).



Abb. M 5: Unterschiedliche Phänotypen von *S. domuncula*, gewachsen auf einem Schneckengehäuse. Der Schwamm ist vergesellschaftet mit einem Einsiedlerkrebs der Gattung *Paguristis*.

3.1.3.4 *Suberites massa*

Ordnung: Hadromerida (TOPSENT 1894)

Familie: Suberitidae (SCHMIDT 1870)

Gattung: *Suberites* (NARDO 1833)

Art: *S. massa* (NARDO 1847, AVANT 2005)

Massive, hemisphärikale Art, hell-orange bis weißlich-gelb (AVANT 2005). Etwa faustgroß, kann bis zu 30 cm hoch und 10 cm im Durchmesser werden (Abb. M 6). Sehr zerfurchte Oberfläche, fest und rau, mit kleinen Poren aus irregulären Graten die in einander übergehen. Zwischenräume zwischen den Graten können mit Sediment gefüllt sein. Das Schwammgewebe kontrahiert, wenn es aus dem Wasser genommen und Luftsauerstoff ausgesetzt wird. Spiculaskellett aus Tylostylen mit abgerundeter Wulst an einem Ende (BOURY-ESNAULT & RÜTZLER 1997, AVANT 2005). Kommt in Häfen, Ästuaren und Gebieten mit variabler Salinität, vorzugsweise auf Felsen, Steinen, aber auch Muschelschalen und Schneckenhäusern vor. Semikryptische Art, in schattigen Arealen, auch mit sehr niedrigem Wasserstand, mit starken Turbulenzen oder moderater Strömung vorkommend. Beschriebene Naturstoffe aus der Art sind die karotenoiden Pigmente Suberixanthin und Alloxanthin (AIELLO *et al.* 1995). Die Art wurde freundlicherweise von Dr. Gugel (Universität Stuttgart, Zoologisches Institut) bzw. Prof. van Soest (Zoologisches Museum Amsterdam, Holland) anhand von in Alkohol konservierten Gewebepräparaten bestimmt. Die Art kam erst zu einem späteren Zeitpunkt



zum Pool der verwendeten Schwammarten, so dass sie in einigen Versuchen nicht genutzt werden konnte.

Abb. M 6: *Suberites massa* auf Schneckengehäuse (im Bild nicht sichtbar), mit Einsiedlerkrebs der Gattung *Paguristes* vergesellschaftet.

3.2 Methoden

3.2.1 Schwammfragmente

3.2.1.1 Herstellung von Schwammfragmentträgern

Zur Kultivierung von Schwammfragmenten wurden aus handelsüblichen Objektträgern (Roth AG, Karlsruhe), so genannte Schwammfragmentträger hergestellt. Mit einem Diamantglas-schneider wurden einige Objektträger orthogonal zur Längsachse in ca. 5 mm breite Stücke geteilt, um sie als Abstandshalter zu nutzen. An beiden Längsenden eines Objektträgers wurden die Abstandshalter mit meerwasserbeständigem Silikonkleber aufgeklebt (Dohse, Grafschaft-Gehlsdorf) und darauf ein zweiter Objektträger verklebt. Durch ausüben von Anpressdruck wurden überschüssige Silikonmengen aus den Klebestellen-Zwischenräumen herausgepresst, so dass der Abstand aller Schwammfragmentträger eines Typs nahezu gleichgroß war. Die Fragmentträger wurden in zwei Ausführungen angefertigt: mit einem Abstand von ca. 1 mm zwischen den beiden Objektträgern (Trägertyp I) und mit einem Abstand von ca. 2 mm (Trägertyp II). Hierzu wurden entsprechend zwei Abstandshalter zwischen den Objektträgern verklebt. Auf der Außenseite wurde ein 2 * 3 cm großes Stück Millimeterpapier als Maßstab und die Kodierung des Fragments, gedruckt auf wasserfestem Papier, mit dem Fragmentträger verklebt (Abb. M 7).

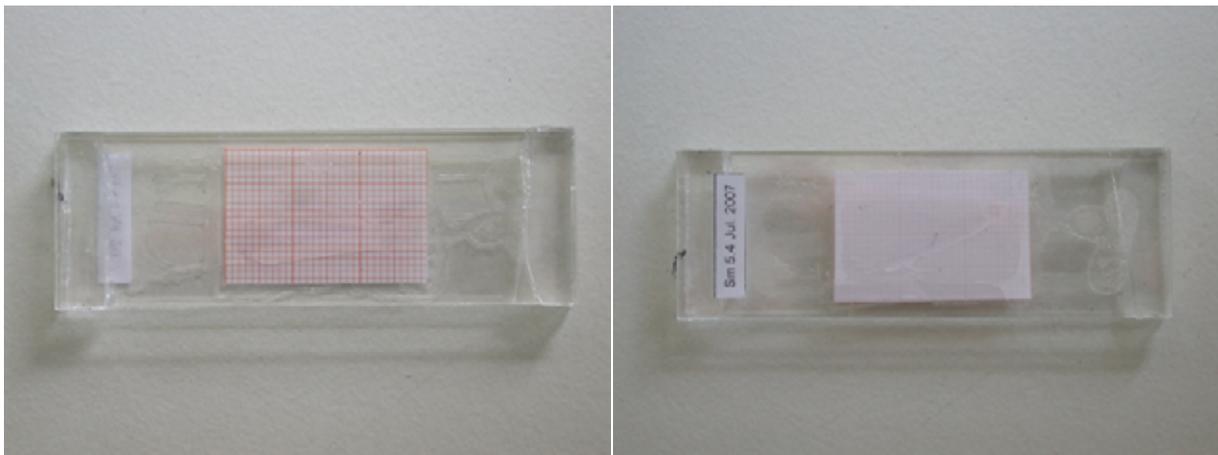


Abb. M 7: Schwammfragmentträger Typ II (links: Vorderseite des Trägers mit eingeklebtem Millimeterpapier als Maßstab, rechts: Rückseite mit Codierung des Fragments (Sm = Schwammart *Suberites massa*, 5.4 = Fragmentnummer bzw. Klon, Jul. 2007 = Herstellungszeitpunkt des Fragments).

Anschließend folgte eine Trocknungsphase des Klebers von etwa 24 h. Die Fragmentträger wurden vor dem Einsetzen eines Schwammfragments für 24 h in ASW gewässert, um Essigsäure- und Silikonkleberreste zu entfernen. Zudem bestand dadurch die Möglichkeit, dass sich auf der Glasoberfläche der Träger ein dünner Biofilm bildet. Ein vorhandener Biofilm ermöglicht den Schwammfragmenten ein besseres Festheften, denn sie finden auf sehr glatten Flächen wie Glas wahrscheinlich nur schlecht Halt und wachsen deshalb schlechter an (CHARACKLIS & MARSHALL 1990).

3.2.1.2 Kultivierungsmodule

Für eine permanente Frischwasserversorgung der Schwammfragmente, wurden die Fragmentträger (3.2.1.1) in Kultivierungsmodule (Abb. M 8) mit angeschlossener Pumpe, Typ 1000.220 (Eheim, Deizisau), eingestellt auf 100 l h^{-1} Förderleistung eingesetzt. Die Fragmentträger wurden von unten durchströmt, so dass alle anfallenden Metabolismus-Endprodukte der Schwammfragmente u.ä. nach oben aus dem Träger gespült und durch die im Becken herrschende, überstreichende Strömung über dem Kultivierungsmodul, entfernt wurden.

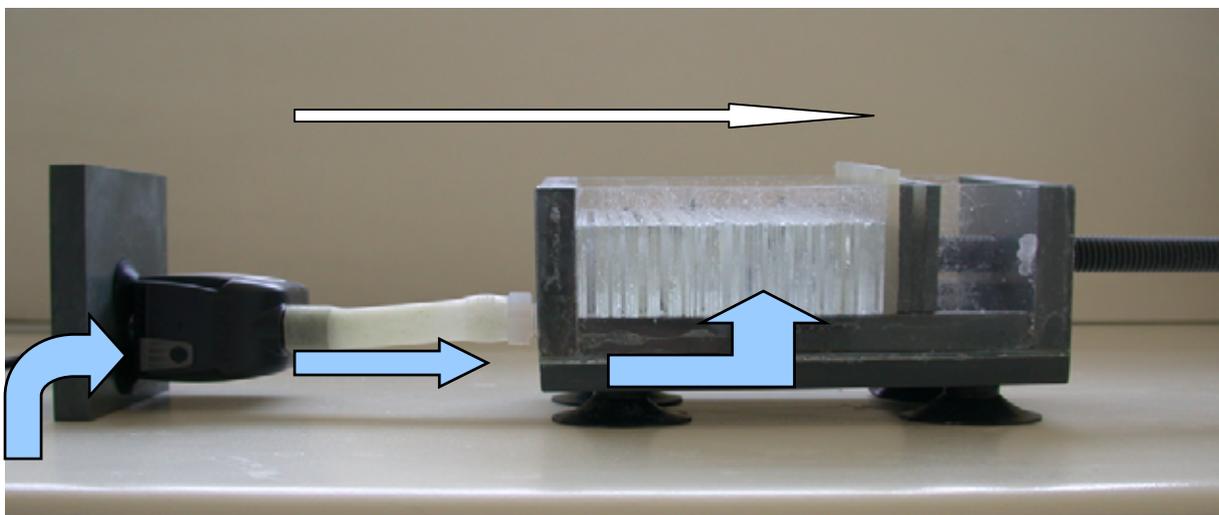


Abb. M 8: Kultivierungsmodul mit angeschlossener Pumpe zur permanenten Durchströmung der Fragmentträger. Pfeile geben die Strömungsrichtung des Wassers an.

3.2.1.3 Photographische Dokumentation

Um Veränderungen der Fragmentfläche oder der Organisationsstruktur des Gewebes von Schwammfragmenten (3.2.1) zu dokumentieren, wurden zweidimensionale Fotos der Fragmente im wöchentlichen bis vierwöchentlichen Intervall aufgenommen. Die Fotos wurden mit einer Digitalkamera, COOLPIX 995 (Nikon, Düsseldorf) bzw. einem Lesegerät zur Auswertung von Agarose-Gelen, Alpha Imager, (Biozym, Hessisch-Oldendorf) aufgenommen. Die Veränderung der Fragmentfläche wurde mit Computerprogramm, Alpha Ease, vers. 3.21 (Biozym, Hessisch-Oldendorf) bestimmt. Dazu wurde die Messung der Fragmentfläche (A) für jedes Fragment dreimal wiederholt ($A_{1..3}$) und der Mittelwert aus diesen Messungen bestimmt (\bar{x}). Die Fläche jedes Fragments A_e ($e = 1, 2..n$) wurde auf ein Referenzmaß von 1 cm^2 , das für jedes Fragment separat gemessen wurde normiert (TURON *et al.* 1998, DE CARALT *et al.* 2003). Berechnungen der spezifischen Wachstumsraten der Schwammfragmente erfolgten mit den Formeln 1 - 4 (6.2). Zusätzlich wurden Fotos der eingesetzten Fragmente in der „Dickenansicht“ im Fragmentträger aufgenommen. Diese Fotos wurden auf einem Stereomikroskop, SZ61 (Olympus, Hamburg) mit Kameraaufsatz für Digitalkamera, COOLPIX 995 (Nikon, Düsseldorf) in einer wassergefüllten Schale gemacht, so dass die Fragmente nicht mit Luftsauerstoff in Kontakt kamen. Mit den Fotos sollte belegt werden, dass die Schwammfragmente während der Kultivierung nicht in der Fragmentdicke geschrumpft waren und an beiden Trägerseiten anlagen.

Von den in Objektgläser (3.2.2.1, Abb. M 10) eingesetzten multizellulären Reaggregate und Gemmulae (3.2.3.1) bzw. in 24-Loch-Platten (3.2.3.5), wurden nach dem Einsetzen Fotos auf einem Stereomikroskop, SZ61 (Olympus, Hamburg) mit Kameraaufsatz für Digitalkamera, COOLPIX 995 (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen. Mit diesen Fotos wurden die Anzahl und der Ausgangszustand der eingesetzten Gemmulae dokumentiert.

Zur Dokumentation der aus Immobilisaten (3.2.4) extrahierten und mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente (3.2.4.4), wurden Agarose-Gele (3.2.4.4 - 3.2.4.5) auf einem Lesegerät zur Auswertung von Agarose-Gelen, Alpha Imager, mit Programm Alpha Ease, vers. 3.221 (Biozym, Hessisch-Oldendorf) bei UV-Licht ($\lambda = 302 - 365 \text{ nm}$) auf sichtbare Bandenmuster untersucht, fotografiert und ausgewertet.

Für einen Vitalnachweis bzw. zur Detektion der fluoreszierenden Marker der immobilisierten Schwammzellen (3.2.4.1 - 3.2.4.2) wurden Aufnahmen von Quetschpräparaten bzw. Dünnschnittpräparaten der Immobilisate (3.2.4.2) auf einem Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager Z1, Apotome, Power supply AxioCam MRm (Zeiss, Göttingen) aufgenommen.

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm des Mikroskops, Axio Vision 3.1, wurden verschiedene Schritte zur Kontrastanreicherung bzw. Helligkeitsveränderung an den Aufnahmen vorgenommen. Weitere Fotos des gleichen Präparats, das für die FITC-Aufnahmen verwendet worden war, wurden mit anderen Fluoreszenzfiltern (für DAPI-, CY 3- und CY 5- Färbungen) aufgenommen, um diese für Vergleichszwecke in Mehrkanalbildern übereinander zu legen.

3.2.1.4 Screening nach geeigneten Schwammarten für Fragmentierungsversuche

Mit einem Screening wurde ermittelt, welche Schwammarten sich für Fragmentierungsversuche eignen. In einer wassergefüllten Schale, um die Fragmente nicht dem Luftsauerstoff auszusetzen, wurden mit einem sterilen Skalpell Fragmente mit ca. 3 x 3 mm Kantenlänge von funktionellen Schwammindividuen der Arten *A. aerophoba*, *A. polypoides*, *C. nucula*, *C. reniformes*, *P. ficiformis* und *S. domuncula* hergestellt. Von jeder Art wurden je 5 Fragmente in Schwammfragmentträger Typ I und in Typ II eingebracht (3.2.1.1). Die Fragmentträger wurden in Kultivierungsmodule (3.2.1.2), mit einem geringen Wasserdurchsatz (100 l h⁻¹) in die Kultivierungsbecken A - D (3.1.1) bei 18 - 20 bzw. 25 °C Wassertemperatur und einer Salinität von ~ 36 platziert. Wöchentlich wurden von den Fragmenten Fotos über einen Zeitraum von 6 - 8 Wochen aufgenommen und auf Veränderungen in Gewebestruktur oder Fragmentfläche untersucht (3.2.1.3).

3.2.1.5 Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von Wassertemperatur und partikulärer Nahrung

Von Individuen der Schwammarten *A. aerophoba*, *A. polypoides*, *C. nucula*, *C. reniformes* und *S. domuncula* wurden Fragmente mit einer Kantenlänge von 3 x 3 mm hergestellt, in Fragmentträger Typ I und II eingesetzt und in vier Kultivierungsmodulen eingebracht (Tab. M 1). Die Kultivierungsmodule wurden in den Kultivierungsbecken A und B (25 °C) bzw. C (20 °C) und D (18 - 20 °C Wassertemperatur), bei einer Salinität von ~ 36 platziert. Veränderungen der Fragmentfläche wurden durch wöchentlich aufgenommene Fotos dokumentiert (3.2.1.3).

Tab. M 1: Anzahl eingesetzter Fragmente je Schwammart in die Kultivierungsmodule A - D ($N_{\text{gesamt}} = 102$).

Schwammart	Modul A	Modul B	Modul C	Modul D
Aa	6	6	5	5
Ap	3	3	3	3
Cn	5	5	5	5
Cr	6	6	5	5
Sd	6	6	6	8

Der beschriebene Versuchsaufbau wurde gleichzeitig genutzt um zu untersuchen, welchen Effekt eine Ernährung von Schwammfragmenten mit partikulärer Nahrung hat. Zwei Bakterienstämme, *Janibacter limosus* (Hel 01) und *Halomonas variabilis* (Hel 04), ein α -Proteobakterienstamm (SB 89) und *Vibrio* sp., (SB 177) wurden als Futterorganismen im Versuch eingesetzt (9.1.1). Die Bakterienstämme wurden in verschiedenen Medien kultiviert (9.1.2, Tab. A 1a-e), nach dem Erreichen einer entsprechenden OD „geerntet“, zentrifugiert, mit ASW gewaschen und resuspendiert. Die Menge bzw. das Volumen der zudosierten Bakterien wurde so gewählt, dass die Zellzahl im Wasser des Kultivierungsbeckens bei $5 \cdot 10^5$ Zellen ml^{-1} lag. Während der Versuchsdauer wurden in unregelmäßigen Abständen Proben genommen und die Zellzahl ml^{-1} , der gelöste (DOC) und der partikuläre Kohlenstoffgehalt (POC) gemessen, bzw. der Gesamtkohlenstoffgehalt (TOC) berechnet. Die Zellzahl wurde mit einem Zellcounter, Casy, Modell TT (Innovatis, Schärfe System, Reutlingen) und der Kohlenstoffgehalt mit Kohlenstoff-Analyser (Shimadzu, Duisburg) bestimmt. Der TOC lag während des Versuchs bei 1,02 - 1,63 mg l^{-1} und der POC bei 0,3 - 1,11 mg l^{-1} .

3.2.1.6 Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit der Initialgröße

Um den Einfluss der Initialgröße bzw. -dicke der Schwammfragmente auf das Wachstumsverhalten und die Überlebensrate zu untersuchen, wurden nur Fragmente von *A. aerophoba* und *S. domuncula* verwendet. Es wurden möglichst gleichgroße Fragmente (3 x 3 mm, je 13 Fragmente in Trägertyp I und 13 Fragmente in Trägertyp II) hergestellt, um zu verhindern das sich signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten ergeben, die Vergleiche sehr erschweren, oder unmöglich machen würden (NICKEL & BRÜMMER 2003). Die Fragmente wurden in Kultivierungsmodulen (3.2.1.2), in Kultivierungsbecken A - D eingefügt (3.1.2) (Wassertemperatur ~ 18 °C, Salinität ~ 36).

Die Fragmente wurden 4x täglich mit einer Kombination aus Hel 01, Hel 04, SB 89, *Vibrio* sp., *Synechococcus* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* als Nahrungspuls gefüttert (Zielzellzahl im Beckenwasser: $5 \cdot 10^5$ Zellen ml^{-1}) (TOC: $1,69 \text{ mg l}^{-1}$, DOC: $1,19 \text{ mg l}^{-1}$). Die Veränderung der Fläche der einzelnen Fragmente bzw. deren Vitalität wurde wöchentlich durch Fotos bestimmt und dokumentiert (3.2.1.3). Die Überlebensrate der Fragmente wurde als Verhältnis noch lebender Fragmente zur Anzahl der ursprünglich eingesetzten Fragmente [%] bestimmt.

3.2.1.7 Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in natürlichem Meerwasser

Der Einfluss von Licht auf das Wachstum von Schwammfragmenten in natürlichem Meerwasser (RMW, Salinität 38.0, durchschnittliche Wassertemperatur $17,4 \text{ }^\circ\text{C}$) wurde am Institut „Ruđer Bošcovič“, Rovinj, in zwei Kultivierungsbecken (beleuchtet bzw. abgedunkelt, Abb. M 9, 9.3) untersucht. Beide Becken wurden mit Korallensand und Kies etwa 2 - 5 cm hoch gefüllt, wodurch die Ausbildung einer Infauna ermöglicht werden sollte, um für die eingesetzten Schwämme naturähnliche Bedingungen zu schaffen. Durch permanenten Durchfluss von frischem Meerwasser, wurde im Becken eine geringe Strömung erzeugt. Eine Filtration des Meerwassers erfolgte nicht (BATEL, pers. Mitteilg.). Außer den im Wasser enthaltenen Nahrungspartikeln, wurde den Fragmenten kein zusätzliches Futter angeboten. Durch die jahreszeitlichen Schwankungen der Wassertemperatur (3.1.1), sowie der Nahrungsqualität und -quantität im zugeleiteten Meerwasser, wurden die Fragmente unter nahezu identischen Bedingungen wie im natürlichen Habitat kultiviert.

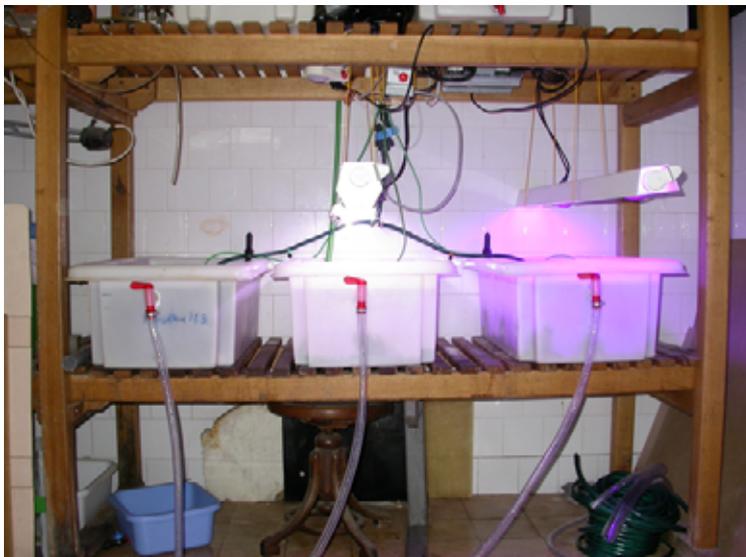


Abb. M 9: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Licht auf das Wachstum von Schwammfragmenten in Becken mit permanentem Meerwasserdurchfluss. Im Bild links ist das abgedunkelte Becken zu sehen (hier noch nicht abgedeckt), in der Bildmitte das beleuchtete Becken, das 10 h am Tag mit einem 250 W Tageslichtstrahler beleuchtet wurde, rechts ein weiteres, nicht zum Versuch gehörendes Becken. Foto: A. Klöppel.

Um den Effekt einer Beleuchtung bzw. Dunkelheit auf Schwammfragmente zu untersuchen, wurde über einem Kultivierungsbecken ein Leuchtbalken (Breflein, Espelkamp) mit Tageslicht-Leuchtstoffröhren (Osram, München), mit einer Photonenflussdichte von ca. 100 - 300 $\mu\text{E m}^2 \text{sec}^{-1}$ installiert. Die Beleuchtung war täglich 10 h eingeschaltet, um einen annähernd natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren. Ein zweites Kultivierungsbecken mit Meerwasserdurchfluss, wurde mit einem Deckel abgedunkelt (9.3). Von funktionellen Exemplaren der Schwammarten *A. aerophoba* und *S. domuncula* wurden Fragmente (ca. 3 x 3 mm) hergestellt. Die Anzahl der Fragmente im beleuchteten Becken betrug für *A. aerophoba* (N = 8) und für *S. domuncula* (N = 9), sowie im abgedunkelten Becken Aa (N = 9) und Sd (N = 8). Zusätzlich wurden je 3 Buds von *Tethya* sp. in Fragmentträger vom Typ I eingesetzt und die Kultivierungsmodule mit den Fragmentträgern im beleuchteten bzw. abgedunkelten Kultivierungsbecken platziert. Die Fläche aller Fragmente wurde zum Startzeitpunkt des Versuchs (August 2006) und zum Endpunkt (April 2007) durch Fotos dokumentiert (3.2.1.3).

3.2.1.8 Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in künstlichem Meerwasser

Um den Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in künstlichem Meerwasser (ASW) zu untersuchen, wurden Fragmente von *A. aerophoba* und *S. domuncula* von ca. 10 x 10 mm (für Aa) bzw. ca. 2 x 2 mm (für Sd) hergestellt. Von jeder Art wurden jeweils acht Schwammfragmente in Trägertyp I und in acht in Trägertyp II (3.2.1.1) eingefügt, in Kultivierungsmodule (3.2.1.2) eingesetzt und diese in Kultivierungsbecken E (3.1.2) bei einer Wassertemperatur von ~ 18 °C und einer Salinität von ~ 36 platziert. Die Schwammfragmente wurden täglich für 10 h mit einem 250 W Tageslichtstrahler (Gewiss, Wenden) mit einer Photonenflussdichte von ca. 100 - 200 $\mu\text{E m}^2 \text{sec}^{-1}$ beleuchtet. Die Veränderung der Fragmentfläche jedes Fragments wurde in wöchentlichem Intervall durch Fotos bestimmt (3.2.1.3).

3.2.1.9 Einfluss von Extrakten aus marinen Tieren auf das Wachstum von Schwammfragmenten

Durch Verwendung eines RPMI-1640-Komplexmediums zur Kultivierung, angereichert mit einem Extrakt aus Tintenfisch (*Loligo* spp., s.u.) wurde versucht, Schwammfragmente von *A. polypoides*, *S. domuncula* und *S. massa* zu ernähren und ein Wachstum der Fragmente zu erzielen.

RPMI - Kulturmedium

Das verwendete komplexe Kulturmedium, RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), wurde durch Anreicherung mit verschiedenen Salzen und essentiellen Aminosäuren (Tab. A 3) für die Kultivierung von marinen Organismen (Salinität ~ 33 - 36) modifiziert (CAMACHO *et al.* 2006a). Nach der Anreicherung wurde das Medium durch einen 0,22 µm Bottletop-Filter (Nalgene, Hereford, UK) sterilfiltriert. Der pH-Wert der Lösung bei 20 °C lag bei ~ 7,2 - 7,4.

Herstellung des Tintenfisch-Extrakts

Zur Herstellung des zum RPMI-1640 Komplexmediums hinzugefügten Tintenfischextrakts, wurden 400 g Tuben von *Loligo* spp. (Costa Meeresspezialitäten GmbH, Emden) mit einem Stabmixer zerkleinert und mit sterilfiltriertem ASW auf 2000 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde 45 min in einer Zentrifuge, Avanti JA-10 (Beckmann-Coulter, Krefeld) bei 10.960 g zentrifugiert, der Bodensatz verworfen und der fast klare Überstand durch einen Rundfilter, Ø 125 mm, Maschenweite 20 µm (Roth AG, Karlsruhe) vorfiltriert. Anschließend wurde der Extrakt durch einen 0,22 µm Bottletop-Filter (Nalgene, Hereford, UK) sterilfiltriert, in 50 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -30 °C eingefroren.

Von *A. polypoides*, *S. domuncula* und *S. massa*, wurden jeweils 12 Fragmente hergestellt, in Fragmentträger Typ II eingesetzt, fotografiert und vermessen (3.2.1.3). Die Fragmente wurden in einer Sterilarbeitsbank in 50 ml Reaktionsgefäße (sterile Falcontubes, nicht konisch zulaufend, Roth AG Karlsruhe) eingesetzt. Alle Reaktionsgefäße wurden mit einer 5 %igen H₂O₂-Lösung (w/v) in ASW gefüllt und die Fragmente und Fragmentträger für 1 min oberflächensterilisiert, um eine mikrobielle Stabilität im Kulturmedium zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit sterilfiltriertem ASW gespült und mit RPMI + Extrakt (RPMI+E), bzw. RPMI, ASW + Extrakt (ASW+E) oder ASW (Kontrolle) gefüllt. In Klammern sind die für die Medien verwendeten Akronyme angegeben. Je Medium wurden drei Fragmente kultiviert.

In die Reaktionsgefäße ohne Extraktzusatz wurden ~ 45 ml RPMI bzw. ASW gefüllt. In die Reaktionsgefäße mit Extraktzusatz wurden 41 ml Medium gefüllt und der Extrakt 10 % (v/v) hinzu pipettiert, so dass in allen Gefäßen das Volumen der jeweiligen Kultivierungsmedien gleich groß war. Das Volumen der Fragmentträger betrug ca. 5 ml, so dass in allen Reaktionsgefäßen das Endvolumen bei ~ 50 ml lag. Das jeweilige Kulturmedium wurde drei Mal pro Woche in einer Sterilarbeitsbank gewechselt und Fragmentträger und Schwammfragmente bei jedem Mediumwechsel und nach jeder Flächenmessung mit einer 5 %igen H₂O₂-Lösung (w/v) in ASW (9.2), sowie 1x pro Monat mit einer 5 %igen NaClO- Lösung in ASW (w/v) oberflächensterilisiert (CAMACHO *et al.* 2006a). Die Reaktionsgefäße mit den Fragmenten wurden auf einem Thermoschüttler, Multitron 2 (Infors, Bottmingen, CH), bei 18 ± 1 ° C und 40 rpm, in Dunkelheit inkubiert (DE ROSA *et al.* 2001). Die Fotodokumentation der Flächenveränderung der Fragmente (3.2.1.3) erfolgte anfänglich alle zwei Tage, nach 2 Wochen Versuchsdauer nur noch in zwei- bis vierwöchentlichem Intervall.

3.2.1.10 Ernährung von Schwammfragmenten mit Komplexmedium

Von Individuen der Schwammarten *A. polypoides* (N = 3), *S. domuncula* (N = 3) und *S. massa* (N = 6) wurden Fragmente (3 x 3 mm) hergestellt und in Fragmentträgern Typ II (3.2.1.1) im Kultivierungsmodul (3.2.1.2) in Kultivierungsbecken I (3.1.2) eingebracht. Zur Ernährung der Schwammfragmente wurde einmal wöchentlich eine Mischung aus 1 g partikulärem Krebs- und Fischfutter (Novo Crabs, JBL, Neuhofen; Granules für Meerwasserfische, TetraMarin, Melle) (TOC: 5,14 mg l⁻¹, DOC: 2,1 mg l⁻¹) ins Kultivierungsbecken gegeben. Zusätzlich wurden 10 ml unvergälltes 99,98 %iges Ethanol zum Ausgleich des C : N -Verhältnis ins Becken zudosiert. In einem zweiten, vergleichbarem Kultivierungsbecken, Becken J (3.1.2) wurden parallel weitere Fragmente von *A. polypoides* (N = 3), *S. domuncula* (N = 2) und *S. massa* (N = 5) ohne Futterzugabe als Kontrolle kultiviert. Die Wassertemperatur in beiden Becken lag bei ~ 18 °C, die Salinität bei ~ 36. Veränderungen der Fläche aller Fragmente wurden über 140 Tage Versuchsdauer durch Fotos bestimmt (3.1.1) und die Wachstumsraten der Fragmente mit den Formeln 1 - 4 (6.2) berechnet.

3.2.1.11 Wachstum von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen

In Versuch 3.2.1.11 wurden Fragmente von *A. aerophoba* und *S. domuncula* gleicher Größe wie in Versuch 3.2.1.7 hergestellt und untersucht, ob Schwammfragmente mit partikulärer Nahrung, Ethanol und weiteren gelösten Substanzen (Eisencitrat, Natronwasserglas, Hefeextrakt, Pepton) ernährt werden können. Die Schwammfragmente wurden in Fragmentträger vom Typ II (3.2.1.1) eingesetzt und auf acht Kultivierungsmodule aufgeteilt (je Modul und Art 12 Fragmente). Je ein Modul wurde in Becken H₁ - H₈ (3.1.2), bei einer Wassertemperatur von ~ 18 °C und einer Salinität von ~ 36 eingebracht.

In den Becken H₁ - H₈ wurde entweder eine Einzel-Substanz, oder eine Kombination aus mehreren Substanzen (Tab. M 2) zudosiert. Täglich wurden 100 µl unvergälltes 99.98 %iges Ethanol in Modulbecken H₁ - H₇ pipettiert. Eisencitrat (Fe) wurde als 0,01 M Stocklösung angesetzt. Silikat (Si) wurde als Natronwasserglas-Stocklösung (NaF₆Si) in ASW, mit ~ 2,6 g l⁻¹ Si eingesetzt. Beide Stocklösungen wurden in entsprechenden Volumina in Modulbecken H₂ - H₇ pipettiert, um die Zielwerte im Beckenwasser (Tab. M 2) zu erreichen. Hefeextrakt und Pepton wurden als Stocklösung (10 g l⁻¹) gelöst in VE-Wasser hergestellt, autoklaviert und in Becken H₅ bzw. H₆ pipettiert (Tab. M 2). Als partikuläre Nahrung wurde *Synechococcus* sp. in Schüttelkolbenkultur in F/2 - Medium gezüchtet (9.1.2, Tab. A 1a-c). Die Zellen wurden für 5 min in einer Zentrifuge, Avanti JA-10 (Beckmann-Coulter, Krefeld) bei 10.960 g zentrifugiert, in sterilfiltriertem ASW resuspendiert und gewaschen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Suspension in entsprechendem Volumen in Einzelbecken H₇ pipettiert, um den in Tab. M 2 angegebenen Zielwert zu erreichen. Mit Ausnahme von Ethanol (EtOH) wurden alle Substanzen nur 1x wöchentlich zudosiert. In Becken H₈ wurden ungefütterte Schwammfragmente als Kontrolle kultiviert.

Vor der Zugabe von partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen wurden die Modulbecken H₁ - H₈ vom Filterbecken-Wasserkreislauf getrennt, um ein Vermischen der zudosierten Substanzen zu vermeiden (3.1.2, Abb. M 2). Wöchentlich wurden 50 % des Wasservolumens jedes Modulbeckens erneuert, um ein Akkumulieren der Substanzen zu verhindern bzw. um nicht konsumierte, partikuläre Futterorganismen zu entfernen. Veränderungen der Fläche jedes Schwammfragments wurden in zweiwöchentlichem Intervall durch Fotos bestimmt (3.2.1.3).

Tab. M 2: In Modulbecken H₁ - H₇ zudosierte gelöste Substanzen bzw. partikuläre Futterorganismen. Angegeben sind die Zielwerte der zudosierten Substanzen bzw. Futterorganismen im Beckenwasser (ASW).

Modulbecken Nr.	Substanz/ Futterorganismus	Zielwert im Becken
H ₁	EtOH	5 mg C l ⁻¹
H ₂	EtOH + Fe	30 µmol l ⁻¹
H ₃	EtOH + Si	60 µmol l ⁻¹
H ₄	EtOH + Fe + Si	s. o.
H ₅	EtOH + Hefeextrakt	8,3 µg l ⁻¹
H ₆	EtOH + Pepton	8,3 µg l ⁻¹
H ₇	EtOH + Fe + Si + <i>Synechococcus</i> sp.	1 * 10 ⁶ Zellen ml ⁻¹
H ₈	Kontrolle	-

3.2.2 Multizelluläre Reaggregate

3.2.2.1 Herstellung der multizellulären Reaggregate

Für die Herstellung von multizellulären Reaggregaten (MZRA), wurde eine Kombination aus mechanischer und chemischer Dissoziation angewendet, um den osmotischen Stress durch die chemische Dissoziation für die Schwammzellen zu minimieren. Beide Dissoziationsmethoden wurden zudem kombiniert angewendet um sicherzustellen, dass möglichst viele Zellen vereinzelt wurden und nur wenige, kleinere Gewebestücke verblieben.

Gewebestücke von *A. polypoides* und *S. domuncula* (jeweils ca. 3 - 6 cm³ Vol.) wurden mit einem Pistill durch ein handelsübliches Plastik-Küchensieb mit 500 µm Maschenweite, in eine Petrischale (ø 10 cm) gefüllt mit 5 ml Kalzium-Magnesium-freiem Seewasser (CMFSW, MÜLLER *et al.* 1978) gepresst. Die entstandene Suspension aus Schwammzellen in CMFSW wurde für 20 min auf einem Thermoschüttler, Multitron 2 (Infors, Bottmingen, CH) bei 100 rpm geschüttelt. Die Suspension wurde im nächsten Schritt durch eine 100 µm und anschließend durch 55 µm Gaze (vom A.-Wegener-Institut, Bremerhaven, zur Verfügung gestellt) filtriert. Der Filtrationsschritt diente dazu, verbliebene Gewebsfragmente und Spicula aus der Suspension zu eliminieren, welche die Bildung von MZRA beeinträchtigen könnten. Nach der Filtration wurde die Suspension zweimal für 2 min bei 332 g in einer Multifuge 1_{S-R} (Heraeus, Düsseldorf) zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 1 - 5 ml ASW resuspendiert. Abschließend wurde die Zellsuspension in Plastikpetrischalen (ø 3 cm), im Thermoschüttler bei 30 rpm (ohne Beleuchtung, bei 18 °C) für ca. 2 - 4 Tage kultiviert, bis sich MZRA gebildet hatten. Um die entstandenen MZRA zu kultivieren, wurden Objektglaträger für die Verwendung in Kultivierungsmodulen (3.2.1.2) entwickelt (Abb. M 10).

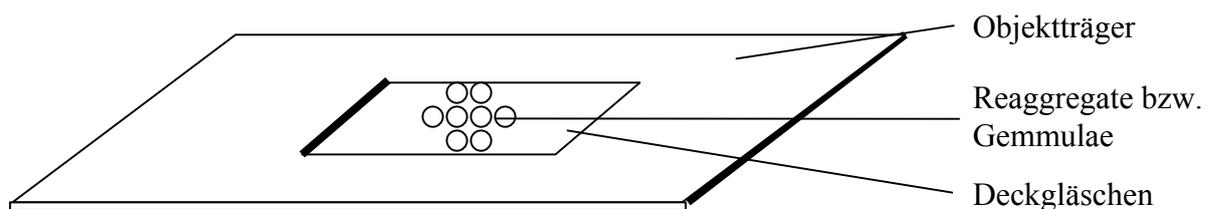


Abb. M 10: Skizze der Objektglaträger für die Kultivierungsversuche mit Reaggregaten und Gemmulae.

Zur Herstellung der Objektglaträger wurden Deckgläschen an einer Seite mit Silikonkleber (Dohse, Grafschaft-Gehlsdorf) auf einem Objektträger (Roth AG, Karlsruhe) befestigt (Abb. M 10), so dass sich zwischen Objektträger und Deckgläschen ein Spalt von ca. 0,5 mm ergab. MZRA von *A. polypoides* bzw. *S. domuncula* wurden unter das Deckgläschen eingesetzt und die Objektglaträger mit den MZRA in Kultivierungsmodulen (3.2.1.2) in Kleinaquarien mit ca. 12 l Volumen kultiviert. Die Wassertemperatur in den Kleinaquarien betrug 18 - 22 °C, die Salinität wurde manuell mit Salinitätsmesser Knick, Typ 911 Cond (Portamess, Berlin) überwacht und durch Zumischung von VE-Wasser bei zu hoher Salinität, nahezu konstant bei 36,4 gehalten. Wöchentlich wurden die MZRA auf morphologische Gewebe- oder Flächenveränderungen untersucht und Fotos aufgenommen, um die Veränderungen zu dokumentieren (3.2.1.3).

3.2.2.2 Ernährung multizellulärer Reaggregate mit gelösten Substanzen

In 32 Objektglaträger (Abb. M 10) wurde jeweils ein MZRA von *A. polypoides* bzw. *S. domuncula* eingesetzt und je Schwammart wurden zwei Objektglaträger in ein Kultivierungsmodul (3.2.1.2) eingefügt. Jeweils ein Kultivierungsmodul wurde in die Becken H₁ - H₈ (3.1.2) bei einer Wassertemperatur von ~ 18 °C und einer Salinität von ~ 36 platziert. Die MZRA in Objektglaträgern wurden mit den gleichen gelösten Substanzen und partikulären Futterorganismen (Tab. M 2) ernährt, um einen Vergleich zwischen den untersuchten Kultivierungsmethoden (Schwammfragmente, 3.2.1, multizelluläre Reaggregate, 3.2.2, und Gemmulae, 3.2.3) ziehen zu können. Wöchentlich wurden die MZRA auf morphologische Gewebe- oder Flächenveränderungen untersucht und Fotos aufgenommen (3.1.2.3).

3.2.3 Gemmulae

3.2.3.1 Auskeimversuche mit *S. domuncula* - Gemmulae

Von mehreren *S. domuncula*-Individuen (3.1.3.3) wurde mit einem Skalpell das Schwammgewebe entfernt und die unter dem Gewebe, direkt auf dem Schneckengehäuse liegenden Gemmulae (Abb. M 11), vorsichtig mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen. Die gesammelten Gemmulae wurden unter einem Mikroskop, Eclipse E200 (Nikon, Düsseldorf) einzeln, gezählt und jeweils ~ 10 Gemmulae in einen Objektglaträger eingesetzt (3.2.2.1, Abb. M 10).

Die Gemmulae in Objektglaträgern wurden in Kultivierungsmodule eingesetzt (3.2.1.2) und in einem Kleinaquarium (~ 12 l Volumen) bei Raumtemperatur (ca. 20 - 22 °C, in ASW, Salinität ~ 36) kultiviert.

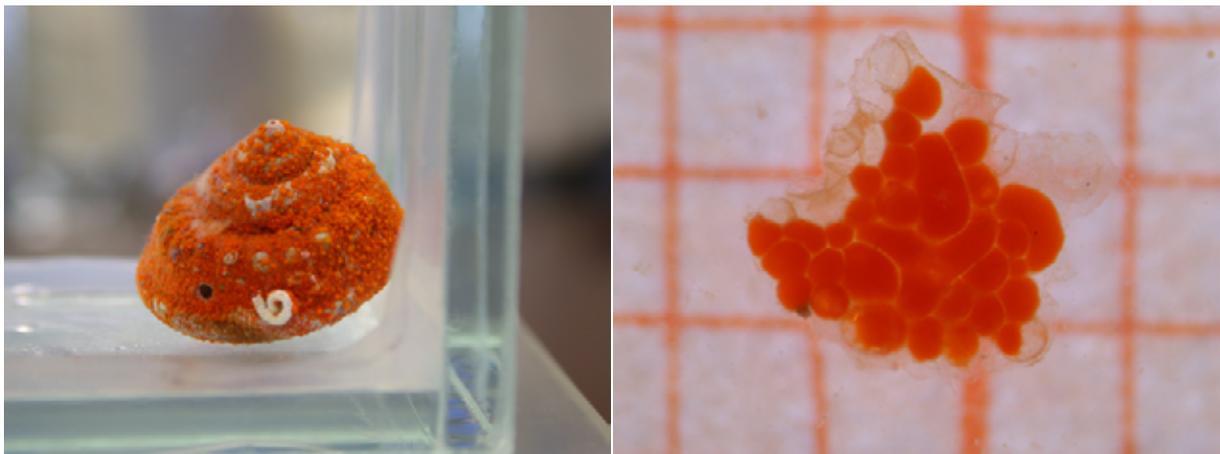


Abb. M 11: Gemmulae von *S. domuncula* auf einem Schneckengehäuse (links), sowie in Objektglaträger eingesetzte Gemmulae (rechts). Im Hintergrund ist das in den Objektglaträger eingeklebte Millimeterpapier als Referenz-Maßstab zu erkennen.

In Anlehnungen an die Beschreibungen der Entwicklungsstufen von keimenden Gemmulae zu Jungschwämmen nach FELL (1974) und JETTON *et al.* (1987) wurde die Auskeimung der Gemmulae in 5 Stadien eingeteilt:

1. Gemmulae im Träger sind ohne sichtbare Anzeichen von Auskeimung.
2. Beginnende Auskeimung der Gemmulae sichtbar, die aber weniger als die Hälfte der eingesetzten Gemmulae im Objektglaträger umfasst, planares Ausbreiten von Zellen ist zu beobachten.

3. Mehr als die Hälfte der im Objektglaträger eingesetzten Gemmulae sind ausgekeimt, aber noch kein Osculum sichtbar.
4. Weit mehr als die Hälfte der eingesetzten Gemmulae im Objektglaträger ist ausgekeimt, deutlich sichtbares Osculum bzw. Oscula, beginnende innere Organisation des aquiferen Systems ist zu erkennen.
5. Nahezu alle Gemmulae im Objektglaträger sind ausgekeimt, Osculum bzw. Oscula sind deutlich ausgebildet, die innere Organisation des aquiferen Systems ist stark fortgeschritten und ein funktioneller Jungschwamm ist zu erkennen.

3.2.3.2 Auskeimung von Gemmulae in Abhängigkeit von der Wassertemperatur

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Gemmulae in Objektglaträgern (Abb. M 10) auskeimen und sich in einen Jungschwamm entwickeln können (4.3.1), wurde untersucht, inwieweit die Auskeimung der Gemmulae von der Wassertemperatur beeinflusst wird. Dazu wurden ca. 12 - 15 Gemmulae pro Träger in 36 Objektglaträger eingesetzt. Jeweils 12 Objektglaträger in Kultivierungsmodulen (3.2.1.2) wurden in drei Kleinaquarien (~ 12 l Volumen, ASW) bei 15 °C (Becken G₁), 18 - 20 °C (Becken G₂) und 22 - 25 °C (Becken H₈) inkubiert (Tab. M 3). Das Wasser in den Becken wurde wöchentlich gewechselt. Die Auskeimung und die weitere Entwicklung der Gemmulae wurden durch wöchentlich aufgenommene Fotos dokumentiert (3.2.1.3).

Tab. M 3: Anzahl der in Objektglaträger eingesetzten und bei unterschiedlichen Wassertemperaturen inkubierten Gemmulae in Kleinaquarium G₁, G₂ und H₈.

Becken	Anzahl Gemmulae (N)	Wassertemperatur [°C]
G ₁	170	15
G ₂	166	18 - 20
H ₈	181	22 - 25

3.2.3.3 Ernährung von Gemmulae und Jungschwämmen mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen

In 6 - 8 Objektglaträger wurden jeweils ~ 10 Gemmulae eingesetzt und in Kultivierungsmodulen (3.2.1.2) in Becken H (3.1.2) platziert (Tab. M 4). Zur Untersuchung inwieweit sich aus Gemmulae gekeimte Jungschwämme ernähren lassen, wurden die gleichen Zusätze an partikulären Futterorganismen und gelösten Substanzen wie in Versuch 3.2.1.8 verwendet. Die Auskeimung der Gemmulae, die Bildung von Jungschwämmen und die weitere Entwicklung der Jungschwämme wurden durch Fotos, aufgenommen in dreitägigem Intervall dokumentiert (3.1.2.3).

Tab. M 4: Anzahl der in Objektglaträger eingesetzten und mit gelösten Substanzen und partikulären Futterorganismen ernährten Gemmulae in Modulbecken H₁ - H₈.

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈
Anzahl Gemmulae	68	75	75	61	68	69	65	88

3.2.3.4 Einfluss von Licht auf die Auskeimung von Gemmulae

Um den Einfluss von Licht als Impuls auf die Auskeimung von Gemmulae zu untersuchen, wurden 71 Gemmulae in Objektglaträger (Abb. M 10) eingesetzt, in Kultivierungsmodule (3.2.1.2) transferiert. Die Gemmulae wurden entsprechend der Versuchsbeschreibung (3.2.1.7) in Becken E (3.1.2) bei einer Wassertemperatur von ~ 18 °C und einer Salinität von ~ 36 kultiviert. Parallel wurden Gemmulae in Objektglaträgern in einem abgedunkelten Kleinaquarium (~ 12 Volumen) als Kontrolle kultiviert. Die Auskeimrate und die Entwicklung der Gemmulae wurden durch wöchentlich aufgenommene Fotos dokumentiert (3.2.1.3).

3.2.3.5 Auskeimung von Gemmulae und Ernährung von Jungschwämmen in 24-Loch-Platten

Versuch 1

Um einen möglichen Effekt des verwendeten Kultivierungsmediums auf die Auskeimrate von Gemmulae zu determinieren, wurden Gemmulae in 24-Loch-Platten (Roth AG, Karlsruhe) in (a) sterilfiltriertem, künstlichen Meerwasser (ASW), (b) sterilfiltriertem, natürlichen Meerwasser aus dem Gebiet von Rovinj (RMW) und (c) Sigma-Meerwasser (SMW, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) kultiviert. Je ein Kultivierungsmedium (ASW, RMW und SMW) wurde in alle Gefäße von jeweils zwei 24-Loch-Platten gefüllt. In jedes Gefäß der 24-Loch-Platten wurden ca. 10 Gemmulae eingesetzt, d.h. je Platte wurde eine Anzahl von ~ 240 eingesetzten Gemmulae verwendet, bzw. $N_{\text{gesamt}} = 1440$ Gemmulae in allen sechs 24-Loch-Platten.

Zur Ernährung der sich bildenden Jungschwämme wurden partikuläre Futterorganismen, *Phaeodactylum tricorutum* und *Synechococcus* sp. eingesetzt (9.1.1). *Synechococcus* sp. wurde in jeweils sechs Gefäßen der mit ASW, RMW bzw. SMW gefüllten 24-Loch-Platten in einer Zellzahl von 10^5 , 10^6 bzw. 10^7 Zellen ml^{-1} pipettiert. Parallel wurden Gemmulae in sechs Gefäßen ohne Nahrung als Kontrolle kultiviert (Abb. M 12). Die Verteilung von *Phaeodactylum tricorutum* wurde entsprechend der von *Synechococcus* sp. vorgenommen (Abb. M 12), aber in Zellzahlen von 10^4 , 10^5 und 10^6 Zellen ml^{-1} . Die Futterorganismen wurden als Nahrungspuls einmal wöchentlich zudosiert. Nicht verwertete partikuläre Futterorganismen wurden durch wöchentlichen Wechsel des Kultivierungsmediums entfernt.

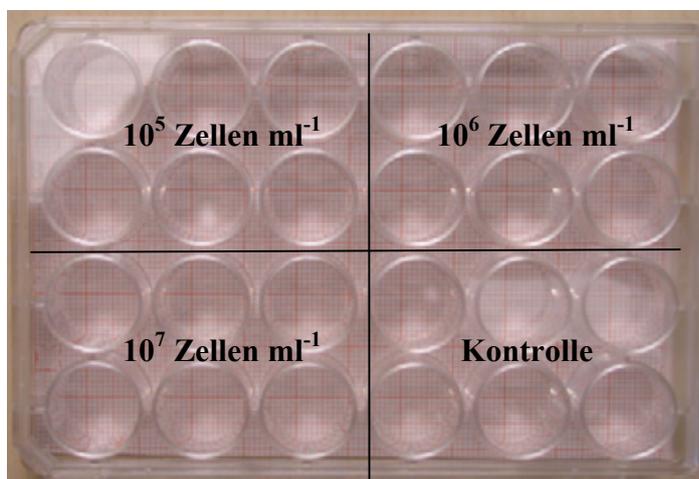


Abb. M 12: Schematische Angabe der verwendeten Zellzahlen von *Synechococcus* sp. zur Ernährung von Jungschwämmen in einer 24-Loch-Platte.

Alle 24-Loch-Platten wurden bei 18 °C, auf einem Thermoschüttler, Multitron 2 (Infors, Bottmingen, CH) bei 40 rpm inkubiert, um das Absedimentieren der Futterorganismen auf den Gefäßboden zu minimieren. Die Entwicklung der keimenden Gemmulae zu Jungschwämmen wurde durch wöchentlich aufgenommene Fotos dokumentiert (3.2.1.3).

Versuch 2

In alle Gefäße von vier 24-Loch-Platten (Roth AG, Karlsruhe), je zwei gefüllt mit ASW bzw. RMW, wurden jeweils ca. 10 Gemmulae eingefügt ($N_{\text{gesamt}} = 960$). Die 24-Loch-Platten wurden für 3 Wochen bei Raumtemperatur, RT, (~ 22 - 25 °C) inkubiert, um die Dauer von der Auskeimung bis zur Bildung von Jungschwämmen zu verkürzen. Erst nach Erreichen von Keimstadium 2 (3.2.3.1) sollten die Gemmulae bei 18 °C weiter kultiviert werden. Das Kulturmedium in den Platten wurde wöchentlich gewechselt.

Als partikuläre Futterorganismen wurden *Synechococcus* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* (9.1.1), in den gleichen Zellzahlen wie in Versuch 1 (3.2.3.5) verwendet. Die Entwicklung der Gemmulae zu Jungschwämmen wurde durch wöchentlich aufgenommene Fotos dokumentiert (3.1.2.3).

3.2.4 Immobilisierung von Schwammzellen

Herstellung einer Schwammzell-Suspension

Schwammgewebe von *A. polypoides* bzw. *S. domuncula* mit einem Gesamtvolumen von jeweils ca. 3 - 6 cm³ wurde mit einem Skalpell in kleinere Stückchen (ca. 1 x 1 mm) zerteilt. Diese Stückchen wurden mit einem Mörserpistill, durch ein handelsübliches Plastik-Küchensieb mit 500 µm Maschenweite, in eine Petrischale (Ø 8 cm) gefüllt mit CMFSW (MÜLLER *et al.* 1978) gepresst. Die Schwammzell-Suspension wurde durch eine Gaze mit 100 µm Maschenweite und anschließend durch eine 55 µm Gaze (vom A.-Wegener-Institut, Bremerhaven, zur Verfügung gestellt) filtriert und in 50 ml Reaktionsgefäße (Roth AG, Karlsruhe) gefüllt. Die Reaktionsgefäße mit der Schwammzell-Suspension wurden in einer Multifuge 1_{S-R} (Heraeus, Düsseldorf) für 2 min bei 332 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und nochmals bei 332 g für 2 min zentrifugiert. Die Pellets aus beiden Zentrifugationsschritten wurden in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und in 3 ml ASW resuspendiert.

Tropflösungen für die Immobilisierung

Es wurden jeweils 105 mg Natrium-Alginat (NA) (Fluka, Taufkirchen) bzw. Cellulosesulfat (CS) (von der TU Berlin, FG Bioverfahrenstechnik zur Verfügung gestellt) eingewogen und in 3 ml CMFSW (MÜLLER *et al.* 1978) gelöst. Beide Lösungen wurden auf einem heizbaren Magnetrührer (Gerhardt, Neusäß) über Nacht bei 30 °C gerührt, um die Löslichkeit der Substanzen zu erhöhen. Die NA- bzw. CS-Lösung wurden auf ~ 20 °C abgekühlt, im Verhältnis 1 : 1 mit der Schwammzellsuspension gemischt und in eine Spritze (Roth AG, Karlsruhe) mit 10 ml Volumen und einer Kanüle (Typ II) gefüllt. Die Polykationenlösung für CS, PDADMAC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde im Mischungsverhältnis 2 : 1 mit ASW gemischt. Die Tropflösungen wurden in die entsprechende Fällbadlösung, 0,5 M CaCl₂ - Lösung für NA, bzw. PDADMAC in ASW für CS + 1 ml Triton 100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zur Senkung der Oberflächenspannung vertropft (Abb. M 13).

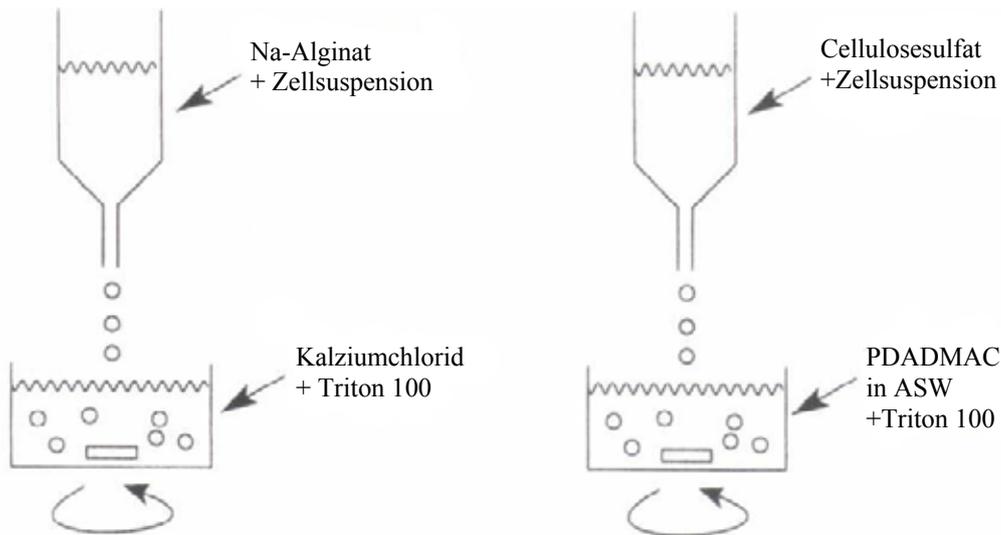


Abb. M 13: Schematische Darstellung des Vertropfens einer Matrix-Schwammzellen-Suspension mit Hilfe einer Spritze und Kanüle in ein Fällbad zur Immobilisierung. Links: Natrium-Alginat (NA) + Zellsuspension wird in 0,5 M CaCl_2 + 1 ml Triton 100[®] vertropft. Rechts: CS + Zellsuspension wird in ein Fällbad aus PDADMAC in ASW + 1 ml Triton 100[®] vertropft (nach: FABER 2004, verändert).

Die entstandenen Kalzium-Alginat- (KA) bzw. CS-Immobilisat-Kugeln verblieben für 15 min in der Fällbadlösung, wurden dann abgeseiht und in ASW gewaschen, in 1000 ml Rundkolben bzw. Erlenmeyerkolben (Roth AG, Karlsruhe) gefüllt mit ASW überführt und auf einem Thermoschüttler, Multitron 2 (Infors, Bottmingen, CH) bei 30 - 40 rpm, in Dunkelheit inkubiert. Das Kulturmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt.

Um die Fragen, (2.2.5.3a, b) ob die Schwammzellen die Immobilisierung überlebt haben und wie lange sie in Kultur überleben beantworten zu können, wurde ein Vitalitäts- bzw. Proliferationsnachweis der Schwammzellen mittels BrdU-Assay durchgeführt (3.2.4.1, 3.2.4.2). Die Durchführung des Assays folgt dem Schema zur BrdU-Inkubation und Detektion von Schwammzellen nach NICKEL & BRÜMMER (2003), mit geringfügigen Modifikationen.

3.2.4.1 Proliferationsnachweis (BrdU-Assay)

Fünf bis zehn KA- bzw. CS-Immobilisat-Kugeln wurden für 12 - 144 h bei 18 °C in 10 μM BrdU (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), gelöst in PBS (9.2, Tab. A 5b), in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (2,5 ml Volumen) inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Immobilisate in eiskaltem 4 % PFA für ca. 2 h fixiert und in PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Immobilisat-Kugeln in einer aufsteigenden Ethanol - Reihe (30, 50, 70, 90 und 100 %), danach in Xylol und in Xylol + Paraffin (Mischungsverhältnis 1 : 1) für jeweils 1 - 2 min dehydriert. Im nächsten Schritt wurden die Immobilisat-Kugeln in Paraffinwachs (Plano, Wetzlar) mit einer Schmelztemperatur von 56 °C eingebettet. Von den eingegossenen Immobilisat-Kugeln wurden mit einem mechanischen Mikrotom (Fa. Jung, Nussloch) ca. 10 - 30 µm dicke Schnittpräparate hergestellt und auf Frost-Objektträger (Menzel, Braunschweig) bzw. auf Objektträger (Roth AG, Karlsruhe), beschichtet mit „Hauptskleber“ (9.2, Tab. A 6) überführt. Mit Roticlear (Roth AG, Karlsruhe), einem Mittel zum Auflösen von Paraffin, wurde das Wachs aus den Dünnschnitten entfernt. Nach 3x waschen mit PBS erfolgte ein Trypsin-Verdau (0,05 % Trypsin und 0,05 % CaCl₂ in PBS), für 5 min bei 37 °C und anschließend eine Denaturierung mit 4 M HCl, für 20 min, bei Raumtemperatur (RT). Die Dünnschnitte wurden mit PBS gewaschen und der pH-Wert mit pH-Testpapier bestimmt (> 6,5). Sofern der pH-Wert niedriger lag, wurde der Waschschrift mit PBS wiederholt.

3.2.4.2 Detektion der mit BrdU markierten DNA

Zu den in BrdU inkubierten Dünnschnitten (3.2.4.1) von KA- bzw. CS-Immobilisat-Kugeln wurden 300 µl Inkubationspuffer (9.2) und ca. 1 - 5 µl eines primären Antikörpers (AK) (monoklonaler Anti-BrdU, Klon BU-33, aufgereinigtes Maus-Immunglobulin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pipettiert. Die Proben wurden für 45 min bei 37 °C inkubiert, denn bei dieser Temperatur bindet der AK besser an die BrdU-Moleküle, wodurch ein quantitativ besseres Ergebnis erzielt werden kann (NICKEL, pers. Mitteilg.). Anschließend wurden die Dünnschnitte 1 - 3x mit PBS gewaschen und 1 - 5 µl eines sekundärer Antikörper (Anti-Maus-AK, produziert in Ziege, markiert mit FITC- Fluoreszenzfarbstoff, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt. Die Präparate wurden auf einem Fluoreszenzmikroskop mit FITC-Farbstofffilter (Zeiss, Göttingen) bei $\lambda = 520 - 530$ nm untersucht und fotografiert (3.2.1.3). Die neusynthetisierte DNA in den Zellkernen, in die BrdU integriert wurde, leuchtet bei Anregung auf, so dass sie sich deutlich vom restlichen Schwammgewebe abhebt (Abb. E 19).

3.2.4.3 Identitätsnachweis

Um die Frage (2.2.5.3c) zu beantworten, ob tatsächlich Schwammzellen kultiviert wurden und nicht fälschlicherweise andere Organismen, wurde ein Identitätsnachweis durchgeführt. Von KA- bzw. CS-Immobilisat-Kugeln wurden pro Schwammart und Probenahme-Zeitpunkt ca. 20 Stück mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistill im Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Die DNA-Extraktion aus den pulverisierten Immobilisat-Kugeln wurde mit einem Fast DNA Spin Kit for soil[®] (FMP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) durchgeführt. Vom Pulver wurden ca. 100 mg in ein Reaktionsgefäß (Lysing Matrix Reaktionsgefäß) gefüllt, 978 µl Na-Phosphat Puffer und 122 µl MT Puffer zugeben (siehe Herstellerprotokoll). Das Lysing Matrix Reaktionsgefäß enthält ein Gemisch aus Keramik- und Siliziumpartikel, die der mechanischen Zerstörung von Zellmembranen dienen und die für die Freisetzung der in der Probe enthaltenen DNA sorgen sollen. Die Lysing Matrix Reaktionsgefäße wurden für 1 min auf einem Vortex (Heidolph, Schwabach) geschüttelt und bei 15.366 g für 30 sec in einer Tischzentrifuge, Modell 5417 C (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, um die festen Bestandteile des Probengemischs zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, 250 µl PPS Reagenz zugeben und durch invertieren gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 5 min bei 15.366 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 ml Binding-Matrix-Lösung zum Überstand gegeben. Die DNA bindet während des 2 min Mischschritts auf dem Vortex an die Matrix. Das Reaktionsgefäß wurde 3 min nicht bewegt, um der Silicamatrix ein Absetzen zu erlauben. 500 µl des Überstandes wurden vorsichtig abgenommen und verworfen, ohne dabei die Matrix zu berühren. Die Binding Matrix wurde im verbleibenden Rest im Reaktionsgefäß resuspendiert und etwa 600 µl der Matrix / Überstand-Suspension auf einen SPIN TM Filter überführt. Die Lösung wurde für 1 min bei 15.366 g zentrifugiert und anschließend 500 µl SEWS-M auf den Filter gegeben, wobei die Matrix auf dem Filter mit einer Pipettenspitze aufgemischt wurde. Das Reaktionsgefäß wurde erneut bei 15.366 g für 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Durch weitere 2 min zentrifugieren wurde die Binding Matrix vorge-trocknet und der SPIN TM Filter in ein neues Catch Tube überführt. Der Filter verblieb für 5 min im offenen Reaktionsgefäß, um vollständig zu trocknen.

Auf den Filter wurden 100 µl DES aufgetropft und die Silicamatrix mit einer Pipettenspitze vorsichtig gemischt. Abschließend wurde das Reaktionsgefäß für 1 min bei 15.366 g zentrifugiert. Die extrahierte DNA wurde anschließend in einer Polymerase-Kettenreaktion, PCR, (3.2.4.4) amplifiziert.

Neben der Verwendung von lebenden, dissoziierten Schwammzellen zu Immobilisierung, erfolgte auch eine DNA-Extraktion aus immobilisierten Schwammzellen, die durch 10 minütige Hitzeeinwirkung (80 °C) abgetötet wurden. Mit dem DNA-Extrakt aus diesen Zellen wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt (3.2.4.4) und die Immobilisat-Kugeln wurden als Kontrolle unter den gleichen Bedingungen wie die lebenden, immobilisierten Schwammzellen kultiviert.

3.2.4.4 DNA - Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Für einen Identitätsnachweis der Zellen der verwendeten Schwammarten mussten Primersysteme (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) kreiert werden, die möglichst spezifisch für die Amplifikation von Schwamm-DNA sind. In Datenbanken für hinterlegte 28S rDNA - Sequenzen (NCBI, Search: CoreNucleotide oder NCBI GenBank, 7.2) wurden für *A. polypoides* und *S. domuncula* Sequenzbereiche ausgewählt (partielle 28S rDNA-Sequenz *A. polypoides* voucher APP0803, gi83416114, DQ 299255.1 bzw. partielle 28S rDNA-Sequenz *S. domuncula* AJ620113.1, gi55580999). Die Sequenzen wurden in Zusammenarbeit mit A. POLITZER (Wild AG, Heidelberg-Eppelheim) unter Verwendung des Programms J-Funghianalyzer (POLITZER, pers. Mitteilg.) so gewählt, dass sie möglichst artspezifisch waren und möglichst geringe Übereinstimmungen mit Sequenzen anderer Organismen aufwiesen. Dabei wurde darauf geachtet, Sequenzen zu wählen, die (a) nicht zur Ausbildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen (hairpins) und Schleifen (loops) oder zur Ausbildung von Primer-Dimeren neigen, (b) die in ihrem Zentrum und am 5'Ende Guanin- und Cysteinreich sind, um eine stabile Anlagerung der Matrize zu gewährleisten, (c) eine nur geringe intramolekulare Komplementarität zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer aufweisen, da die Primer sonst miteinander dimerisieren könnten und nicht an die Zielsequenz binden und (d) möglichst ein Verhältnis von Guanin/Cystein : Adenin/Thymidin von 60 : 40 aufweisen, damit die Schmelztemperatur der DNA nur geringfügig voneinander abweicht (KLEMT 2004, POLITZER, pers. Mitteilg.).

Für beide Schwammarten wurden spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer (s.u.) hergestellt (MWG, Ebersberg) in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der Zielsequenzen eingesetzt und auf ihren Klonierungserfolg getestet.

Primer

Suberites domuncula

Sub = *S. domuncula*-Artspezifisches, SPO = Schwammspezifisches Oligo. Die Länge des zu erwartenden Fragments sollte abhängig von der verwendeten Primerkombination zwischen 770 - 800 Basenpaaren, Bp, liegen.

Vorwärtsprimer (100 pmol μl^{-1})

Sub 1F: 5'-AGC CCC GTG TGC GAC ACC-`3

Sub 2F: 5'-AGC TGC CGA CTC CTC TGC-`3

Sub 3F: 5'-TGA CGT YGG TTG GCG ATG CC-`3

Rückwärtsprimer (100 pmol μl^{-1})

Sub 1R: 5` -TCA ATC GCC CGC AGA CTT CC - `3

Sub 2R: 5` -GCA GAG GAG TCG GCA GC - `3

SPO_SO1R: 5` -CAC T(AGT)G GA(AG) CCC CGG CAT TC - `3

Axinella polypoides

AXN GR = *Axinella*-Gattungsspezifisches, AXN PO = *A. polypoides*-Artspezifisches Oligo. Die Länge des zu erwartenden Fragments sollte abhängig von der verwendeten Primerkombination zwischen 654 - 774 Bp liegen.

Vorwärtsprimer (100 pmol μl^{-1})

AXN GR1F: 5` -CAG GCT CCS YM GGG GC - `3

AXN PO2F: 5` -TAG CCA GTG CAA GGC TGG AG - `3

AXN PO3F: 5` -CTT AGA GCC TCC GAC TGG TTT CG - `3

AXN PO4F: 5` -AGA GCC TCC GAC TGG TTT CG - `3

Rückwärtsprimer (100 pmol μl^{-1})

AXN GR1R: 5` -AGC CCC GGC ATT CCK SG - `3

SPO_SO1R: 5` -CAC T(AGT)G GA(AG) CCC CGG CAT TC - `3

PCR-Reaktionsansatz

Mit einem PCR-Reaktionsansatz (Tab. M 5, 9.2) wurden die DNA-Fragmente, die aus den Immobilisaten extrahiert wurden (3.2.4.3), mit Hilfe von Primern (3.2.4.4) in einem Thermocycler, Mastercycler `gradient` (Eppendorf, Hamburg) in einem zyklischen Prozess amplifiziert. Für *S. domuncula* konnte auf ein vorhandenes PCR-Thermocyclerprogramm zurückgegriffen werden (Abb. M 14). Für *A. polyoides* wurde versucht die Primerkombination, welche die besten Ergebnisse liefert, in einer Touchdown-PCR zu bestimmen (Abb. M 15).

Tab. M 5: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation der aus Immobilisaten extrahierten DNA. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien mit Konzentration und entsprechendem Volumen [μ l].

Reagenz	Menge [μ l]
10x MgCl ₂ Puffer	2,5
10 mmol dNTP`s	2,5
Taq-Polymerase	0,125
Vorwärtsprimer	0,1
Rückwärtsprimer	0,1
PCR-Wasser (H ₂ O)	13,175
DNA-Probe	5,0

PCR - Ablaufschema

In Abb. M 14 sind die einzelnen Schritte des verwendeten PCR-Thermocycler-Programms für die Amplifikation der DNA-Extrakte aus *S. domuncula*-Immobilisaten und die jeweilige Zeit für den angegebenen Reaktionsschritt schematisch angegeben.

94°C 2:00 min	94°C 1:00 min	58°C 0:45 min	72°C 1:00 min	72°C 10:00 min	4°C ∞
30 Zyklen					

Abb. M 14: Schema des PCR-Thermocyclerprogrammes zur Amplifikation der DNA-Fragmente von *S. domuncula*. Angegeben sind Zyklenanzahl, Temperatur und die zugehörige Dauer jedes Temperatur-Schrittes des Programms.

In Abb. M 15 ist schematisch das Programm der Touchdown-PCR für Amplifikation der DNA-Extrakte aus *A. polypoides* gezeigt.

94°C 2:00 min	94°C 0:30 min	T-1 → 68°C 0:30 min	72°C 1:00 min	94°C 0:15 min	50°C 0:15 min	72°C 0:30 min	72°C 2:00 min	4°C ∞
18 Zyklen				13 Zyklen				

Abb. M 15: Schema des Touchdown-PCR-Thermocyclerprogrammes zur Amplifikation der DNA-Fragmente von *A. polypoides*. Angegeben sind Zyklenanzahl, Temperatur und die zugehörige Dauer jedes Temperatur-Schrittes des Programms.

3.2.4.5 Gel-Elektrophorese

Der Nachweis der erfolgreichen PCR-Reaktion, d.h. Amplifikation der aus den Immobilisaten extrahierten DNA, erfolgte durch Bestimmung der Produktlänge mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Hierzu wurde ein 1 - 2 %iges Agarose-Gel (Roth AG, Karlsruhe), das für den Einsatz von DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von > 1 kbp konzipiert ist verwendet. Es wurden 2 - 4 g Agarose (Roth AG, Karlsruhe) eingewogen und in entsprechendem Volumen des Laufpuffers (1x TAE, 9.2) gelöst. Die Lösung wurde aufgekocht und in eine Gelform mit Kämmen für 15 Spuren gegossen. Von den DNA-Proben wurden jeweils 8 µl mit 2 µl Ladepuffer (loading dye, #R0611, Fermentas, St. Leon-Roth) versetzt und in die Spuren des Agarose-Gels aufgetragen. Die Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarose-Gel erfolgte bei 100 V cm⁻¹, in einer Gelelektrophoresekammer, Model 200/2.0 Power Supply (Bio-Rad, München/Herts, UK) für 20 - 60 min.

Als Referenz für die Länge der vervielfältigten DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker (DNA-Ladder) für 1 kbp lange Fragmente genutzt (#SM1163 bzw. #SM0318, Fermentas, St. Leon-Roth). Durch eine 20 - 25 minütige Färbung mit Ethidiumbromid, EtBr (2 mg l⁻¹ in Aqua bidest.), in einem Schwenkbad, Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach) wurden Banden im Gel sichtbar gemacht. Das Gel wurde auf einem Lesegerät für Agarose-Gele, Alpha Imager mit Computerprogramm, Alpha Ease, vers. 3.21 (Biozym, Hessisch-Oldendorf) auf sichtbare Bandenmuster untersucht, fotografiert und ausgewertet (3.2.1.3).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Schwammfragmente

4.1.1 Screening nach geeigneten Arten für Fragmentierungsversuche

Im Screening nach geeigneten Schwammarten für Fragmentierungsversuche (3.2.1.4) zeigte sich, dass sich einige Arten sehr gut für diesen Verwendungszweck einsetzen lassen, wohingegen andere als ungeeignet betrachtet werden müssen (Tab. E 1).

Tab. E 1: Überblick über die getesteten Schwammarten auf ihre Eignung für Fragmentierungsversuche. ++ = sehr gut geeignet, + = gut geeignet, - = nicht geeignet.

Schwammart	Eignung für Fragmentierungsversuche
<i>A. aerophoba</i>	+
<i>A. polypoides</i>	++
<i>C. nucula</i>	-
<i>C. reniformes</i>	-
<i>P. ficiformis</i>	-
<i>S. domuncula</i>	++
<i>S. massa</i>	++
<i>Tethya</i> sp.	-

Gut bis sehr gut geeignete Arten für eine Fragmentierung waren *A. aerophoba*, *A. polypoides*, sowie *S. domuncula* und *S. massa*. Fragmente von *A. polypoides*, *S. domuncula* und *S. massa* wuchsen durch planare Ausbreitung an der Trägeroberfläche fest und begannen ihre innere Struktur umzuorganisieren. *S. domuncula*- und *S. massa*-Fragmente zeigten zudem schon nach ca. 1 - 2 Tagen teilweise ein deutliches Abrunden der Schnittkanten. Nach 2 - 6 Wochen Kultivierungsdauer konnten deutliche Anzeichen der Umstrukturierung des Gewebes und der Ausbildung eines aquiferen Systems, gekennzeichnet durch die Ausbildung von dünnen Kanälen im Schwammgewebe, beobachtet werden. Es war auch zu verzeichnen, dass sich die *S. domuncula*-Fragmente nach einigen Wochen abflachten und nicht mehr an beiden Fragmentträgerseiten anlagen (Abb. E 3).

Die Arten *C. nucula*, *C. reniformes* und *Tethya* sp. wurden als nicht geeignet erachtet. Alle *Tethya* sp.-Fragmente starben innerhalb weniger Tage ab und das Fragmentgewebe löste sich auf, so dass nur das Spiculaskellett im Fragmentträger verblieb.

Das Absterben der Fragmente von *C. nucula* und *C. reniformes* war dadurch gekennzeichnet, dass sich das Fragmentgewebe schwarz verfärbte und gleichzeitig hellere, filamentöse Skelettstrukturen freigelegt wurden. Außerdem zeigten sich nach 1 - 2 Tagen ein starkes Abrunden der Schnittkanten und ein Abflachen des Gewebes. In anderen Fällen konnte auch ein Strecken, Abkugeln und Verformen in Richtung des ektodermalen Teils des Gewebes beobachtet werden. Die Fragmente bekamen eine ovoide-ellipsoide Form. Stellenweise war dabei die Bildung einer Art primären Abschlußgewebes zwischen den Epithelien zu beobachten, das sich aber nach wenigen Tagen wieder auflöste. Durch das Fehlen von Anheftungsstellen an der Objektträgeroberfläche wurden die Fragmente nach wenigen Tagen aus den Trägern ausgeschwemmt.

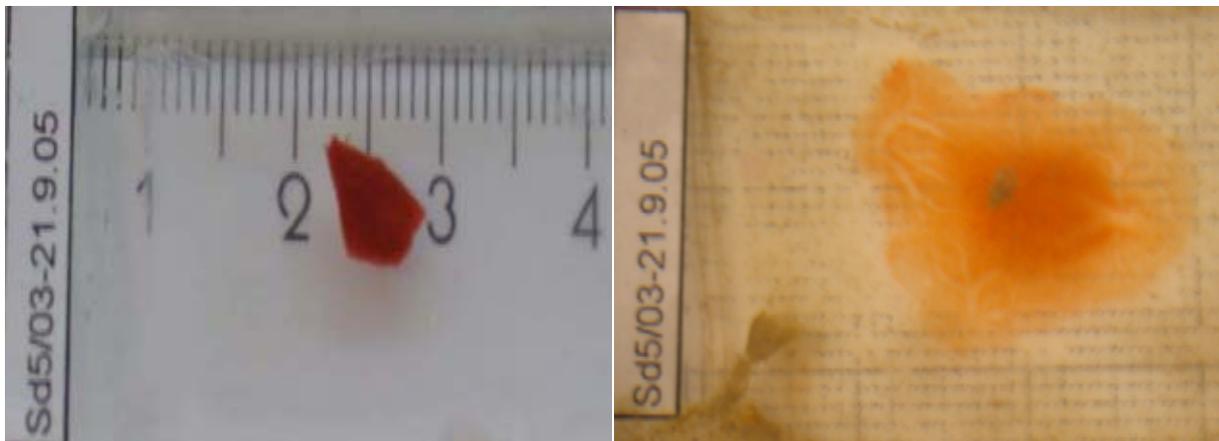


Abb. E 1: *S. domuncula*-Fragment Sd 5/03 (hergestellt am 21.09.2005), zu Beginn des Versuchs (links) und nach 5 Wochen in Kultivierung (rechts).

In der Betrachtung der Ergebnisse, welche Schwammarten für eine Fragmentierung geeignet sind kann festgestellt werden, dass die verwendeten Schwammfragmente ihre Form unterschiedlich schnell und scheinbar entsprechend ihren verschiedenen Habitusformen folgend veränderten. *C. nucula* und *C. reniformes* werden von SIDRI (2004) bzw. SIDRI *et al.* (2004) als geeignete Modellarten für Fragmentierungsversuche dargestellt, da sie einen hohen Grad an Heilungsvermögen besitzen sollen. Entsprechende Beobachtungen konnten im Gegensatz dazu im Screening nicht gemacht werden. Es wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von NICKEL (2001) festgestellt, dass diese Arten nur sehr eingeschränkt für den Einsatz in räumlich „zweidimensional begrenzter“ Trägerkultur geeignet sind.

Fragmente von *A. aerophoba* überlebten verhältnismäßig gut und zeichneten sich durch eine moderate Fähigkeit zur Heilung der erlittenen Verletzung aus. Nach der Fragmentierung setzte bei den *A. aerophoba*-Fragmenten eine Wundheilung und Gewebe-Reorganisation innerhalb weniger Wochen ein, ähnlich den Ergebnissen von VITELLO (2004).

Die Fähigkeit zur schnellen Heilung liegt vermutlich darin begründet, dass die Art eine natürliche Form der Fragmentierung, die Bud-Bildung, zur räumlichen Artverbreitung entwickelt hat und somit gut an Gewebe-Umstrukturierungsprozesse adaptiert ist.

Die Fragmente von *S. domuncula* konnten sich gut an die Kultivierungsbedingungen anpassen und begannen sich schon kurz nach dem Einsetzen an der Oberfläche der Fragmentträger festzuheften (Abb. E 1). Die Schnittkanten wurden abgerundet und das vorhandene Fragmentgewebe unter Bildung eines Pinacoderms und eines aquiferen Systems umstrukturiert. Dabei kam es häufig zum Abflachen der Fragmente (Abb. E 3), die eine Bestimmung der Biomassenzunahme aus zweidimensionalen Messungen der Fragmentfläche erschweren. Das Abflachen erfolgt vermutlich aufgrund der spezifischen Lebensweise von *S. domuncula*. Die Art entwickelt sich aus keimenden Gemmulae als dünne, wenige Mikrometer dicke Schicht auf Schneckengehäusen die dann zu einer, bis zu mehreren Zentimeter dicken, sphäroiden Form heranwächst.

Am besten an die Kultivierungsform anpassen konnten sich die Fragmente von *S. massa*. Die Fragmente dieser Art hefteten sich nur in sehr geringem Umfang am Substrat an und rundeten die Schnittkanten nur geringfügig ab. Bei dieser Schwammart kam es auch kaum zum Abflachen der Fragmente in den Fragmentträgern. Innerhalb des Gewebes der *S. massa*-Fragmente erfolgte eine Strukturumbildung und die Bildung eines aquiferen Systems. Das regenerative Potential und die Überlebensfähigkeit dieser Art nach der Fragmentierung, schien im Vergleich mit den anderen im Screening verwendeten Schwammarten besonders hoch zu sein was sich darin manifestierte, dass die Fragmente selbst lange Perioden ohne Nahrungsversorgung überlebten (Abb. E 12a).

Die Fähigkeit zur Heilung von Verletzungen durch Fragmentierung und zur Gewebeumstrukturierung, war von Art zu Art unterschiedlich stark ausgeprägt. Daher können lediglich die grundlegenden Aspekte zur Reorganisation von verletztem bzw. fragmentiertem Gewebe bei allen Schwammarten als vergleichbar angesehen werden.

4.1.2 Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit von Wassertemperatur und Ernährung

Mit Ausnahme von *Tethya* sp. wurde das gleiche Artenspektrum wie in Versuch 3.2.1.4 verwendet, um die Überlebensraten der Fragmente in Abhängigkeit von der Wassertemperatur und der Ernährung zu untersuchen.

Fragmente der beiden Schwammarten *C. nucula* und *C. reniformes* wurden trotz ermittelter geringer Eignung für Fragmentierungsversuche (4.1.1) verwendet, um den Einfluss von Wassertemperatur und partikulärer Nahrung auf die Überlebensrate an möglichst vielen Schwammarten zu untersuchen. Während der Untersuchung wurde in mehreren Kultivierungsbecken eine Infektion, sichtbar als weißlicher Schleimüberzug auf den Fragmenten festgestellt. Durch Mikroskopieren von Proben dieses Schleims, konnte Pilzmyzel nachgewiesen werden. Außerdem war eine deutliche Gelbfärbung des Beckenwassers sichtbar. Um den Grund für die Verfärbung des Wassers zu finden, wurden die Konzentration von NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , Mg^{2+} und Ca^{2+} , sowie der pH-Wert und der Redoxwert gemessen. Die Konzentration für Nitrat lagen dabei im Beckenwasser durchschnittlich bei 10 - 25 mg l^{-1} (in Ausnahmefällen etwas erhöht bei 30 mg l^{-1}), für Nitrit bei 0 mg l^{-1} , Phosphat 0 - 10 mg l^{-1} , Magnesium 1.000 - 1.400 mg l^{-1} , Kalzium 320 - 440 mg l^{-1} . Der Redoxwert schwankte von minus 70 bis 300 mV und der pH-Wert lag zwischen 7,6 und 8,3. Negative Redox- und leicht niedrige pH-Werte traten dabei hauptsächlich innerhalb der ersten zwei Wochen, nachdem die Schwammfragmente in die Kultivierungsbecken eingesetzt worden waren auf. Neben der Redox- und pH-Wert Messung wurden zusätzlich photometrische Messungen von Huminstoffen im Beckenwasser nach Trinkwasserverordnung (TrinkwV-2001) bei 254 nm (um π -Bindungen von C-O-Verbindungen nachzuweisen) und bei 436 nm (um die Farbe des Wassers nach Farbskala zu bestimmen) durchgeführt. Die Huminstoff-Messungen erfolgten aufgrund der empirischen Feststellung, dass aus einem Anstieg der Konzentration für Huminstoffe eine Verschlechterung der Vitalität der Fragmente resultierte. Die Messungen ergaben jedoch zu keinem Zeitpunkt Auffälligkeiten oder erhöhte Werte für den spezifischen Absorptionskoeffizienten (SAK) bei den gemessenen Wellenlängen. Die SAK-Werte lagen für $\lambda = 254 \text{ nm}$ zwischen 0,001 und 0,16 m^{-1} bzw. für $\lambda = 436 \text{ nm}$ zwischen 0,001 und 0,05 m^{-1} . Trotz der niedrigen SAK-Werte können negative Effekte der Huminstoffe auf die Schwammfragmente nicht ausgeschlossen werden (FRIMMEL, pers. Mitteilg.). In der Wiederholung der Untersuchung, in wie weit Wassertemperatur und zudosierte partikuläre Nahrung einen Einfluss auf die Überlebensrate von Schwammfragmenten haben, ergaben sich die in Abb. E 2a - c graphisch dargestellten Ergebnisse. Bereits nach 10 - 30 Tagen konnte in den Kultivierungsbecken A und B, bei 25 °C Wassertemperatur und Zudosierung von partikulärer Nahrung, ein starker Rückgang der Anzahl vitaler Fragmente von *C. nucula* und *C. reniformes* beobachtet werden. Zum einen lag dies daran, dass mehrere Fragmente aus den Fragmentträgern ausgeschwemmt worden waren, die somit aus der Betrachtung heraus fielen. Zum anderen kam es zum Auflösen des Gewebes und Absterben mehrerer Fragmente.

Die Degeneration des Gewebes begann dabei hauptsächlich im Inneren der Fragmente. Gasblasen, die auf der Außenseite der Fragmente auftraten und die vermutlich H₂S enthielten, zeigten als Indikator die Auflösung des Schwammgewebes an. Sobald schwarze Verfärbungen oder Fäulnisstellen an der Fragmentaußenseite bzw. im Gewebe entdeckt wurden, wurden die betroffenen Fragmente aus dem Versuch entfernt. Nach der anfänglichen Abnahme blieb die Anzahl der vitalen *C. nucula* und *C. reniformes*-Fragmente im weiteren Verlauf bis zum Ende des Versuchs bei einer Überlebensrate von ca. 20 - 25 % konstant. In Kultivierungsbecken C, bei 20 °C Wassertemperatur und Zudosierung von partikulärer Nahrung und Becken D, bei 18 - 20 °C, ohne Nahrungszudosierung, war eine ähnliche Entwicklung zu beobachten.

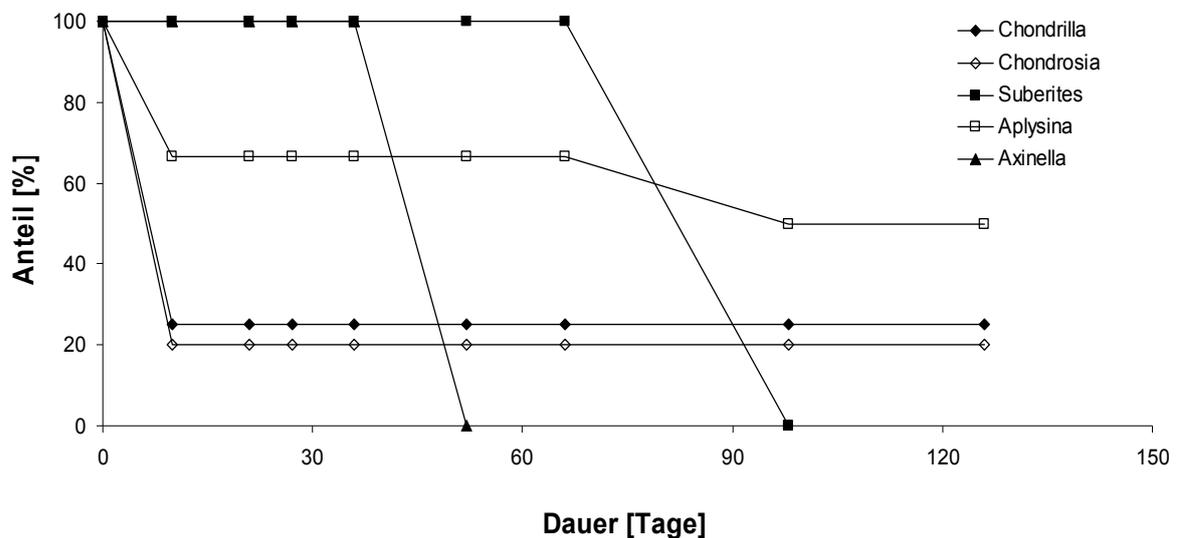


Abb. E 2a: Prozentualer Anteil der vitalen Schwammfragmente über die Dauer des Versuchs (~ 130 Tage) in Kultivierungsbecken A und B, bei 25 °C Wassertemperatur und zudosierter partikulärer Nahrung. Anzahl eingesetzte Fragmente: *C. nucula* = 5, *C. reniformes* = 6, *S. domuncula* = 6, *A. aerophoba* = 6, *A. polypoides* = 3.

Schon kurz nach Beginn des Versuchs (ca. 3 Wochen) starben 30 % der eingesetzten *A. aerophoba*-Fragmente in Becken A und B ab, anschließend stabilisierte sich die Überlebensrate. Bis zum Versuchsende blieb der Anteil der vitalen Fragmente nahezu konstant bei ~ 50 %. In den Kultivierungsbecken C und D mit geringerer Wassertemperatur lag die Überlebensrate dagegen niedriger, bei nur noch 20 % der ursprünglich eingesetzten Fragmente.

Der prozentuale Anteil vitaler *A. polypoides*-Fragmente blieb in allen Kultivierungsansätzen innerhalb der ersten fünf Wochen unverändert bei 100 %. Nach diesem Zeitraum starben die Fragmente in Becken A und B schlagartig ab.

Eine vergleichbare Entwicklung war in Becken D nach ~ 9 Wochen zu verzeichnen. Lediglich in Kultivierungsbecken C stabilisierte sich der Anteil der vitalen Fragmente bei 70 %, gegenüber den ursprünglich eingesetzten Fragmenten und blieb für die restliche Dauer des Versuchs konstant.

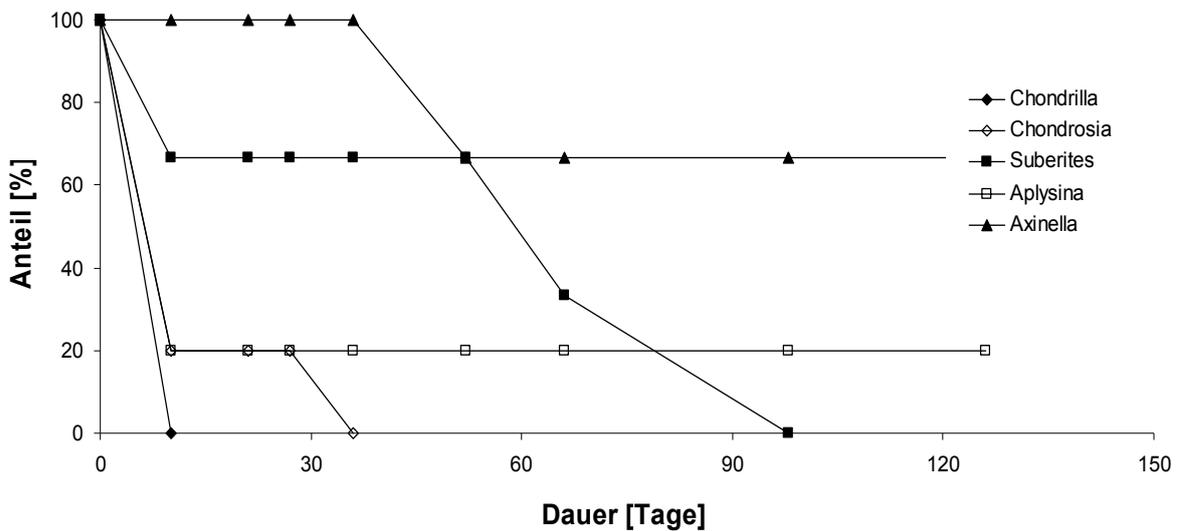


Abb. E 2b: Prozentualer Anteil der vitalen Schwammfragmente über die Dauer des Versuchs (~ 130 Tage) in Kultivierungsbecken C, bei 20 °C Wassertemperatur und zudosierter partikulärer Nahrung. Anzahl eingesetzte Fragmente: *C. nucula* = 5, *C. reniformes* = 5, *S. domuncula* = 6, *A. aerophoba* = 5, *A. polypoides* = 3.

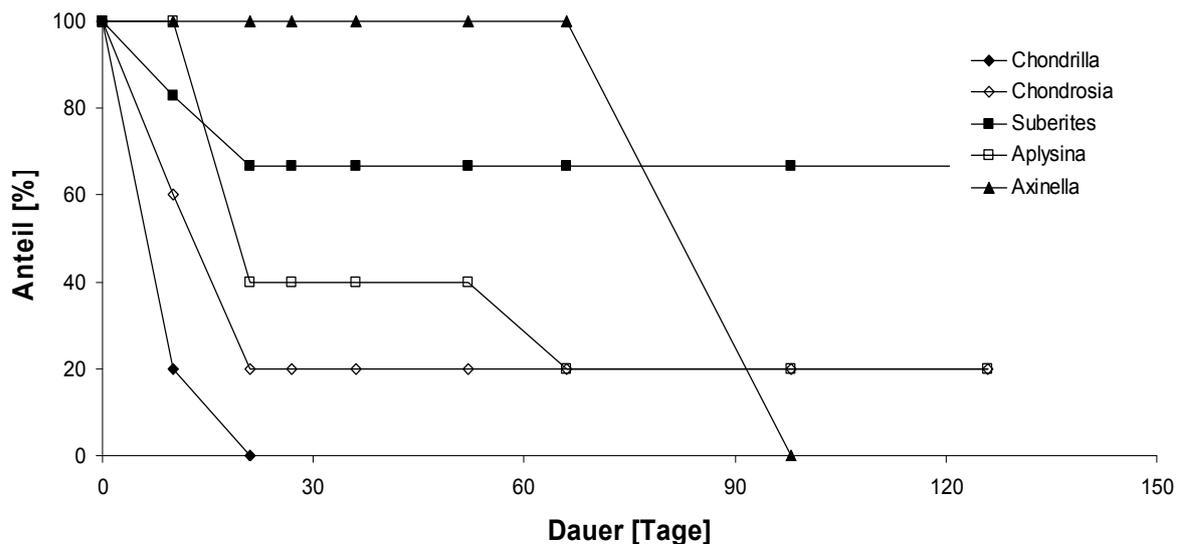


Abb. E 2c: Prozentualer Anteil der vitalen Schwammfragmente über die Dauer des Versuchs (~ 130 Tage) in Kultivierungsbecken D, bei 18 - 20 °C Wassertemperatur, ohne das partikuläre Nahrung zudosiert wurde. Anzahl eingesetzte Fragmente: *C. nucula* = 5, *C. reniformes* = 5, *S. domuncula* = 8, *A. aerophoba* = 5, *A. polypoides* = 3.

Eine ähnliche Entwicklung wie bei den *A. polypoides*-Fragmenten, zeigte sich auch für die *S. domuncula*-Fragmente in Becken A und B nach ~ 10 Wochen. Bis zu diesem Zeitpunkt betrug die Überlebensrate noch 100 %, anschließend verendeten alle Fragmente innerhalb von ~ 3 Wochen. In den Kultivierungsbecken C und D lag die Überlebensrate dagegen höher bei 70 %. Zum Ende des Versuchs, nach 18 Wochen, waren von den insgesamt eingesetzten 140 Fragmenten aller fünf Schwammarten 119 Fragmente verendet (~ 85 %). Die verbliebenen Fragmente waren hauptsächlich *A. aerophoba*- und *S. domuncula*-Fragmente in Trägertyp II. Ein Effekt der Zudosierung von Futterorganismen auf die Überlebensrate der Fragmente, konnte bei keiner Kultivierungstemperatur festgestellt werden.



Abb. E 3: *S. domuncula*-Fragmente zeigen nach ~ 18 Wochen in Kultivierung eine deutliche Reduktion der Fragmentdicke (Abflachen).

Die geringe Überlebensrate der Fragmente die bei Temperaturen von 25 °C kultiviert wurden, im Vergleich zur Anzahl der vitalen Fragmente bei 18 - 20 °C könnte darauf hinweisen, dass die Temperatur der entscheidende Faktor ist, der das Absterben der Schwammfragmente beschleunigt. Niedrigere Sterberaten bei Temperaturen von 18 - 20 °C zeigen, dass je näher die Wassertemperatur in der Kultur am Bereich der Temperaturen des natürlichen Habitats lag (3.1.1), desto höher war die Wahrscheinlichkeit, dass die Fragmente überleben. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch von DE CARALT *et al.* (2003) erzielt. Bei höheren Temperaturen ergeben sich höhere Sterberaten der Schwammfragmente, wodurch angezeigt wird, dass Schwämme vergleichbar zu vielen anderen, marinen Organismen sehr sensitiv auf Temperaturerhöhungen reagieren (DUCKWORTH & BATTERSHILL 2001, AMUI-VEDEL *et al.* 2007). Temperatursenkungen werden dagegen eher toleriert (OSINGA *et al.* 1999a, NICKEL 2001).

Durch die erzielten Ergebnisse wird die unterschiedliche Eignung der verschiedenen Schwammarten für Fragmentierungsversuche in Abhängigkeit ihrer ökologischen Anforderungen unterstrichen. Jede Schwammart hat einen eigenen physiologischen Toleranzbereich für den abiotischen Faktor Wassertemperatur, unter der sie kultiviert werden sollte. *A. aerophoba* als vorwiegend im Flachwasser vorkommende Art (3.1.3.1) wächst besser bei höheren Wassertemperaturen.

S. domuncula als „Tiefwasserart“ (3.1.3.3) bevorzugt kühlere Temperaturen (3.1.1) und stirbt bei höheren Wassertemperaturen verhältnismäßig schnell ab. Eine Erklärung dafür geben BACHINSKI *et al.* (1997), die beschreiben, dass Fragmente von *S. domuncula* sobald sie thermalem Stress ausgesetzt werden, eine Stagnation in Form- oder Volumenänderung zeigen und absterben. Für die parallele Verwendung mehrerer Schwammarten, mit ihren unterschiedlichen ökologischen Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen, muss deshalb ein Optimum für die Wassertemperatur gefunden werden, um die Sterberate der Schwämme so gering wie möglich zu halten.

Ein weiterer untersuchter Aspekt war die Versorgung der Schwammfragmente mit partikulärer Nahrung. OSINGA *et al.* (1998) beschreiben, dass eine adäquate Futterverfügbarkeit der Schlüssel für den Erfolg einer *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen bzw. Schwammfragmenten ist. Erfolgt keine ausreichende Versorgung mit partikulärer Nahrung kommt es zum Absterben der Schwämme durch Verhungern, wobei die Versorgung frisch hergestellter und in Fragmentträger eingesetzter Schwammfragmente mit partikulärer Nahrung erst nach längerer Kultivierung sinnvoll erscheint. In den Fragmenten muss erst ein effizientes aquiferes System gebildet werden, um eine effektive Futteraufnahme zu gewährleisten. Im Gewebe das für die Herstellung der Fragmente hauptsächlich genutzt wurde, sind nur sehr dünne Kanalstrukturen vorhanden, die einen umfangreichen Wasser-, Sauerstoff- und Nahrungstransport limitieren (HOFFMANN *et al.* 2005). Während des Bildungszeitraums des aquiferen Systems (einige Tage bis Wochen) können die Schwämme wahrscheinlich von den im Gewebe gespeicherten Reservestoffen zehren. Erfolgt dann keine ausreichende Nahrungsversorgung bzw. -aufnahme, sterben die Fragmente ab (VITELLO 2004, WEHRL 2006).

4.1.3 Überlebensraten von Schwammfragmenten in Abhängigkeit der Initialgröße

Für die Untersuchung, inwieweit die Überlebensrate von Schwammfragmenten von der Initialgröße der Fragmente abhängig ist, wurden nur *A. aerophoba* und *S. domuncula*-Fragmente verwendet. Dickere *S. domuncula*-Fragmente (2 mm dick, $\sim 20 \text{ mm}^3$), eingesetzt in Trägertyp II, schienen über die Versuchsdauer in geringerem Maß von Gewebsauflösung und vom Absterben betroffen zu sein, als dünnere Fragmente (1 mm dick, $\sim 10 \text{ mm}^3$) in Trägertyp I (Abb. E 4a). Bis zum Versuchsende waren 60 % der eingesetzten Fragmente in Trägertyp II abgestorben, wohingegen nahezu 90 % Fragmente in Trägertyp I bereits zwei bis fünf Wochen nach Versuchsbeginn eine erkennbare Tendenz zum Absterben zeigten.

Dieser Trend setzte sich über die Kultivierungsdauer fort, so dass zum Versuchsende, nach ~ 140 Tagen, nur noch ~ 7 % vitale Fragmente in Trägertyp I vorhanden waren.

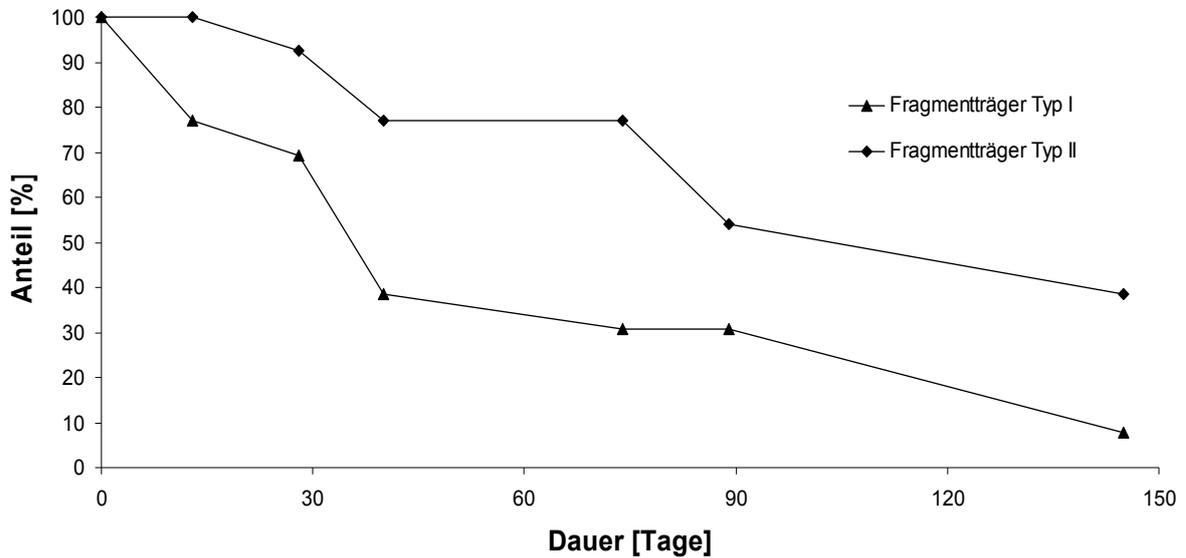


Abb. E 4a: Prozentualer Anteil vitaler *S. domuncula*-Fragmente, abhängig vom Trägertyp in den die Fragmente eingesetzt wurden, über die Kultivierungsdauer (~ 140 Tage) bei 18 °C Wassertemperatur, ohne zudosierte Nahrung. Anzahl eingesetzte Schwammfragmente je Trägertyp, N = 13.

Das Absterben bzw. die Überlebensrate der Fragmente schien neben der minimalen Fragmentbiomasse von der Menge Choanosom und Pinacoderm der Fragmente abhängig zu sein. Empirisch konnte festgestellt werden, dass Schwammfragmente mit weniger als einem Drittel Ectosomanteil an der Gesamtoberfläche, oft ein Abkugeln und Verformen in Richtung des ektodermalen Teils des Fragmentgewebes zeigten und innerhalb weniger Wochen durch eine innere Gewebeauflösung abstarben. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass je größer der Anteil an Pinacoderm und Choanosom am Fragmentgewebe war, desto geringer schien die Tendenz zur Verformung ausgeprägt zu sein. Bei fast allen Fragmenten konnte ein Anschwellen des Choanosoms (und Verkürzen des Pinacoderms) beobachtet werden, was vermutlich auf die Zellreorganisation der Choanocyten zurückgeführt werden kann.

Es wird daher vermutet, dass ein minimaler Anteil von ca. einem Drittel kortikalem Gewebe an der Gesamtoberfläche eines Fragments die Voraussetzung für den Erhalt der Reorganisationsfähigkeit darstellt und für das Überleben essentiell ist.

Fragmente von *A. aerophoba* in Fragmentträgertyp I und II zeigten in den ersten beiden Wochen nach dem Einsetzen in die Träger keinerlei Veränderung der Schnittkanten oder des Gewebes und es waren auch keine Anzeichen einer Reorganisation zu verzeichnen. Nach diesem Zeitraum war bei den Fragmenten in beiden Trägertypen eine abrupte Veränderung der Gewebestruktur zu beobachten. Die Fragmente reduzierten ihre Fläche, verfärbten sich schwarz und verendeten innerhalb der nächsten sechs Wochen (Abb. E 4b).

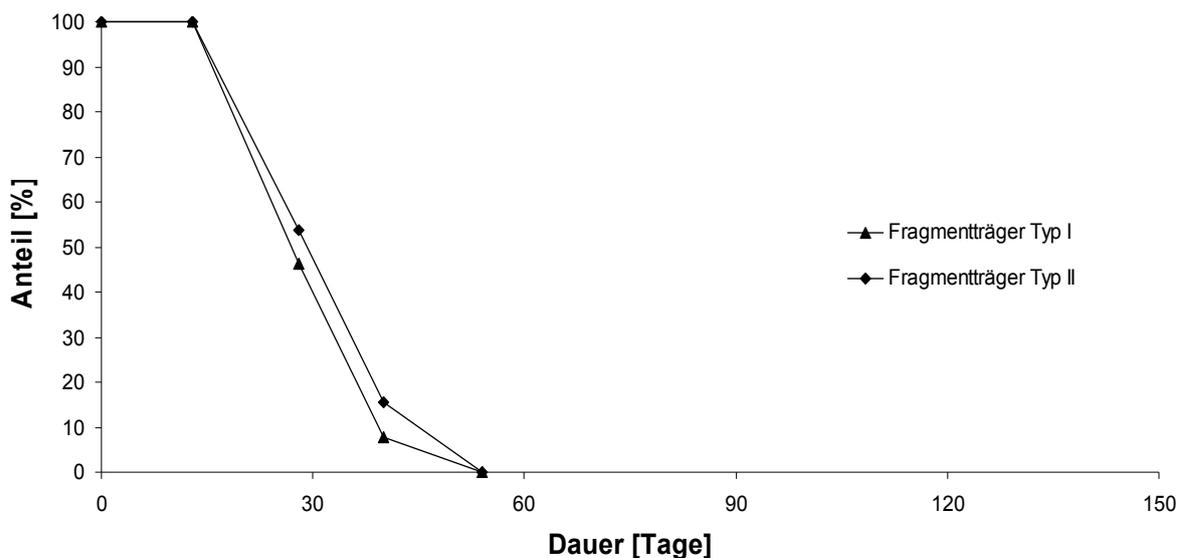


Abb. E 4b: Prozentualer Anteil vitaler *A. aerophoba*-Fragmente, abhängig vom Trägertyp in den die Fragmente eingesetzt wurden, über die Kultivierungsdauer (~ 140 Tage) bei 18 °C Wassertemperatur, ohne zudosierte Nahrung. Anzahl eingesetzte Schwammfragmente je Trägertyp, N = 13.

Aus den Ergebnissen des Versuchs (3.2.1.6, Abb. E 4a, b) wird geschlussfolgert, dass die Fragmentinitialgröße einen Einfluss auf die Überlebensrate von Schwammfragmenten hat. Größere Fragmente besitzen, vermutlich durch mehr Zellmasse und größere Anteile aquiferen Systems eher die Fähigkeit, erlittene Verletzungen zu heilen und ihr Gewebe in Form eines funktionellen, pumpenden Schwammes zu reorganisieren als kleinere.

Die Überlebensrate der Fragmente von *A. aerophoba* und *S. domuncula* über die Kultivierungsdauer unterschied sich deutlich voneinander (Abb. E 4a, b). Es wird angenommen, dass für *S. domuncula* ~ 20 mm³ (Abb. E 4a) eine minimale Menge an Volumen darstellt, um ein Überleben der Fragmente zu sichern. Unterhalb dieses Wertes kommt es zu einem raschen Absterben der Fragmente (Abb. 4a, Fragmentträgertyp I).

Für *A. aerophoba* liegt der Wert für das minimale Fragmentvolumen scheinbar bei mehr als 20 mm³, so dass die verwendeten Fragmente in beiden Fragmentträgertypen innerhalb weniger Wochen abstarben (Abb. E 4b). Scheinbar sind die ersten 2 - 5 Wochen der Kultivierung die kritische Zeit, in der sich die Schwammfragmente an die Kultivierungsbedingungen adaptieren und ein effizientes aquiferes System bilden müssen, um zu überleben. Innerhalb dieser Zeit kann es zu periodischen Körperexpansionen und -reduktionen kommen, die nicht als Reaktion auf einen bestimmten Reiz interpretiert werden können. Kommt es nicht zur Bildung eines effizienten aquiferen Systems, sterben auch die *S. domuncula*-Fragmente in Fragmentträgertyp II, mit ~ 20 mm³ sukzessive ab (Abb. E 4a). Vergleichbare Ergebnisse wurden von DE CARALT *et al.* (2003) für die Schwammart *Corticium candelabrum*, sowie von NICKEL & BRÜMMER (2003) für *Chondrosia reniformis* erzielt. Es wäre allerdings vorstellbar, dass der essentielle Anteil an Pinacoderm und Choanosom, sowie aquiferen Systems, am Gesamtvolumen eines Schwammfragments von der verwendeten Schwammart abhängig ist, wie von WILKINSON & VACELET (1979) und DUCKWORTH *et al.* (1997) beschrieben wurde und bei anderen Arten eventuell größer sein müsste, als bei *A. aerophoba* oder *S. domuncula*. Aufgrund der Feststellungen dieser Untersuchung, wurden in weiteren Versuchen (3.2.1.7 - 3.2.1.11) nur noch Fragmente mit mindestens einem Drittel Anteil Pinacoderm und Choanosom an der Gesamtoberfläche der Fragmente verwendet, um ein Überleben der eingesetzten Schwammfragmente zu sichern.

4.1.4 Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in natürlichem Meerwasser

Ziel dieses Versuchs war es zu untersuchen, inwieweit Licht einen Einfluss auf das Wachstum von Fragmenten photophiler (3.1.3.1) und kryptischer bzw. (semi)-kryptischer Schwammarten (3.1.3.3) hat. Der Einfluss von Licht auf das Wachstum von Schwammfragmenten, wurde in zwei Becken (beleuchtet bzw. abgedunkelt, 3.2.1.7) mit permanenten Meerwasserzufluss (Abb. M 9) untersucht.

Im beleuchteten Kultivierungsbecken kam es innerhalb des Versuchszeitraumes zu einem massiven Wachstum von Braun- und Grünalgen, wodurch das Kultivierungsmodul und die darin befindlichen Fragmente vollständig von der Lichtquelle abgeschirmt wurden (Abb. E 5). Zudem wurde durch das Ansaugen von Algenteilen die Förderpumpe des Kultivierungsmoduls verstopft, wodurch vermutlich die Durchflussrate des Meerwassers verringert wurde.

Es kam nicht zum vollständigen Absterben der Fragmente, aber vier Fünftel der *A. aerophoba*- und zwei Drittel der überlebenden *S. domuncula*-Fragmente hatten ihre Fragmentfläche deutlich reduziert (Abb. E 6). Besonders die *A. aerophoba*-Fragmente hatten ihre Form sehr stark verändert und umstrukturiert. Deren Fläche hatte sich gegenüber dem Wert zu Versuchsbeginn, um durchschnittlich 50 % verringert. Bei einigen der Fragmente war eine innere Gewebedifferenzierung und die Bildung eines aquiferen Systems mit sichtbarem Osculum zu beobachten (Abb. E 7).

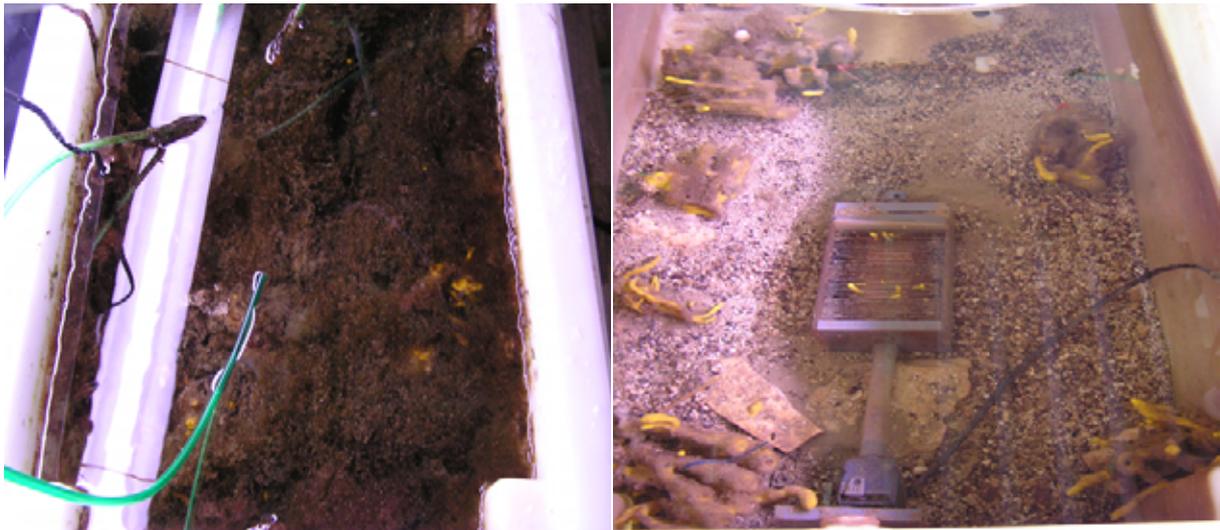


Abb. E 5: Aufnahmen der Kultivierungsbecken in Rovinj, Kroatien, um den Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in natürlichem Meerwasser zu bestimmen, zum Ende des Versuchs. Im linken Bild (beleuchtetes Becken) ist ein massives Algenwachstum zu erkennen, welches das Kultivierungsmodul mit den darin befindlichen Fragmenten vollständig vom Licht abschirmte. Im Bild des abgedunkelten Kultivierungsbeckens (rechts, nach manuellem Entfernen der Algen) ist das Herauswachsen der *A. aerophoba*-Fragmente und Buds durch Gewebeumstrukturierung und Formveränderung, die an der Aussenkante der Fragmentträger abgeschnürt werden, aus den Fragmentträgern zu erkennen.

Das Gros der *S. domuncula*-Fragmente zeigte ebenfalls eine Flächenreduktion (- 90 %) und ein deutliches Absterben von größeren Gewebebereichen, das speziell in den Randzonen der Fragmente auftrat. Ein Abrunden der Schnittkanten, wie es in anderen durchgeführten Versuchen (4.1.1 - 4.1.3) beobachtet worden war, blieb aus. Die Buds von *Tethya* sp. hatten ihre Form am stärksten verändert und ihre Fläche stark ausgedehnt (Abb. E 6).

Im abgedunkelten Kultivierungsbecken (3.2.1.7) war es im Vergleich mit dem beleuchteten Becken zu einem geringeren Algenwachstum gekommen. Trotzdem zeigten sich bei den Fragmenten der drei verwendeten Schwammarten ein ähnlicher Trend der Veränderung und Umstrukturierung, wie bei den Fragmenten im beleuchteten Becken (Abb. E 6).

Die Reduktion der Fragmentfläche, verglichen mit der Fläche zu Versuchsbeginn, fiel bei *A. aerophoba* mit - 20 % gegenüber *S. domuncula* mit - 60 % geringer aus, als im beleuchteten Becken. Die Buds von *Tethya* sp. hatten im abgedunkelten Becken ihre Fragmentfläche gegenüber der Ausgangsfläche um das Zwei- bis Dreifache vergrößert (Abb. E 6 und E 7).

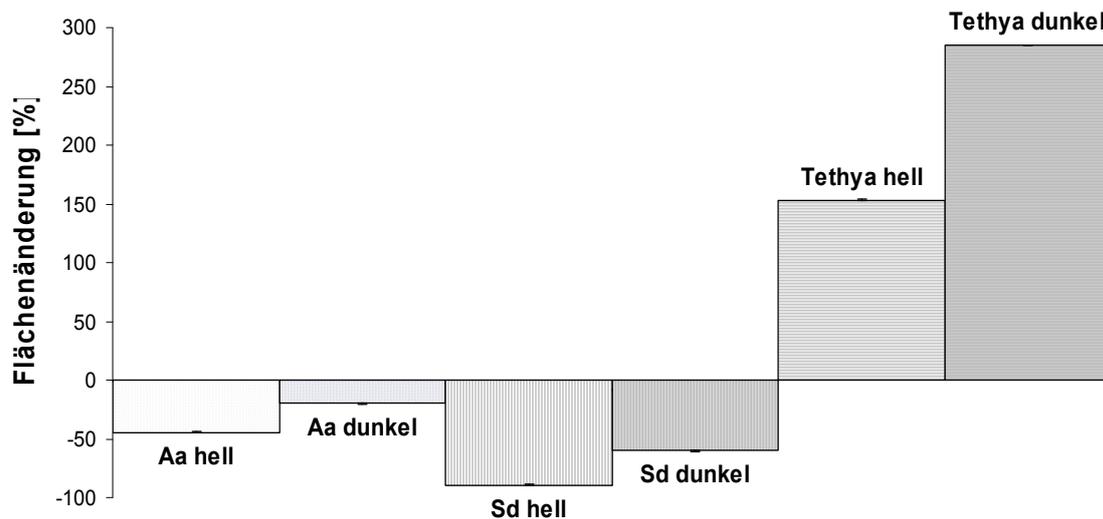


Abb. E 6: Vergleich der Flächenänderungen der Schwammfragmente von *A. aerophoba*, *S. domuncula* und *Tethya* sp. im beleuchteten und im abgedunkelten Kultivierungsbecken in natürlichem Meerwasser, zu Beginn und zum Ende des Versuchs (nach 252 Tagen). Anzahl Fragmente je Becken: beleuchtetes Becken *A. aerophoba* (Aa) = 8, *S. domuncula* (Sd) = 9, *Tethya* sp. = 3; abgedunkeltes Becken Aa = 9, Sd = 8, *Tethya* sp. = 3.

In der Untersuchung wie sich eine Beleuchtung auf die Vitalität von Schwammfragmente auswirkt zeichnete sich ab, dass Licht scheinbar sowohl auf photophile Arten (*A. aerophoba*, 3.1.3.1) als auch auf (semi)-kryptische Arten (*S. domuncula*, 3.1.3.3) einen Einfluss hat. Bedingt durch die Überwucherung der Kultivierungsmodule mit den Schwammfragmenten durch Algen im beleuchteten Becken, kam es zur vollständigen Abschirmung von einfallendem Licht. Durch das Verstopfen der Förderpumpe durch Algenteile kam es weiterhin zu einer Limitierung der Wasserdurchflussrate und dadurch zur Unterversorgung der Schwammfragmente mit gelösten Nährstoffen und Sauerstoff. Diese Limitierung könnte somit das Absterben und die Flächenreduktion der verbliebenen Schwammfragmente verursacht haben, letztendlich der auslösende Faktor für das Absterben der Fragmente bleibt unklar. WILKINSON & VACELET (1979) haben bei ähnlicher Licht- und Strömungslimitation vergleichbare Ergebnisse für die Reduktion der Biomasse und Abnahme der Wachstumsrate ermittelt.

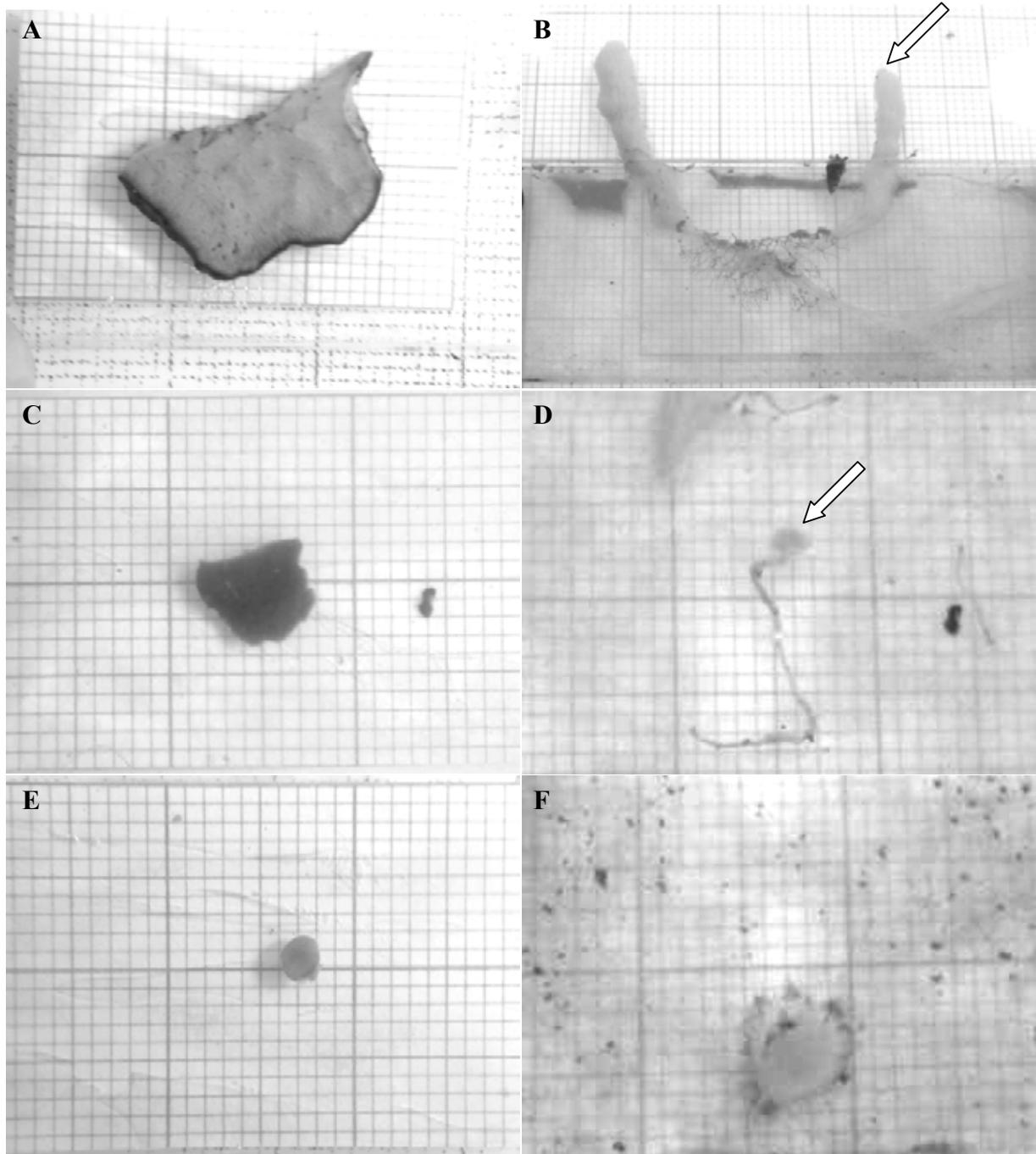


Abb. E 7: Morphologische Veränderungen, Gewebeumstrukturierung und Flächenveränderung, exemplarisch dargestellt am Beispiel der Fragmente Aa 15_1 (obere Reihe), Sd 6_01 (mittlere Reihe) und Tethya 4_01 (untere Reihe) kultiviert im abgedunkelten Becken. Die Fotos A, C und E wurden zu Versuchsbeginn, und B, D und F bei Versuchsende, nach 252 Tagen aufgenommen. In Foto B ist das vom Schwammfragment gebildete Osculum zu sehen (Pfeil) und in Foto D das verbliebene *S. domuncula*-Fragment zu Versuchsende (Pfeil).

Es wäre auch möglich, dass es durch die reduzierte Strömung zu einer Infektion bzw. zu epibiotischen Aufwuchs durch Bakterien gekommen sein könnte, die ab einem Bedeckungsgrad von mehr als 70 % ebenfalls negative Auswirkung auf die Schwammfragmente gehabt hätten, wie von HUMMEL *et al.* (1988) für *Halichondria panicea* bestimmt wurde.

Das es im abgedunkelten Becken zu einem geringeren Absterben der Fragmente kam könnte damit zusammenhängen, dass durch eine geringere Überwucherung die Limitation der Durchflussrate, der Nährstoffe und der Sauerstoffversorgung schwächer ausfiel, wodurch die Schwammfragmente überleben konnten. Eine Hypothese um die Ergebnisse zu erklären, dass die Buds von *Tethya* sp. im Kontrast zu den Fragmenten der beiden anderen Schwammarten ihre Fläche in beiden Becken vergrößerten ist, dass ausreichend Reservestoffe im Schwammgewebe gespeichert waren, so dass es nicht zu einer Nahrungslimitation kam und die Buds nicht vom Absterben betroffen waren.

Um zu klären, ob die *A. aerophoba*- und *S. domuncula*-Fragmente ihre Fläche aufgrund von Nahrungsmangel reduziert hatten, wurde im August 2006 eine Zellzahl- und Partikelbestimmung im Meerwasser, das permanent durch die Kultivierungsbecken floss durchgeführt. Die Messungen im beleuchteten Kultivierungsbecken ergab eine durchschnittliche Zellzahl von $6,223 \cdot 10^4$ Zellen ml^{-1} bei einem Partikeldurchmesser von 1,00 - 1,41 μm . Im abgedunkelten Becken wurde eine durchschnittliche Zellzahl von $3,473 \cdot 10^4$ Zellen ml^{-1} bei einem Partikeldurchmesser von 1,01 - 1,37 μm gemessen. Beide Messwerte lagen damit ca. eine Zehnerpotenz unter der im Normalfall im Meerwasser messbaren Zellzahl ml^{-1} . Partikuläre Nahrung (POC) war scheinbar nicht in ausreichendem Umfang im Wasser vorhanden um die Fragmente adäquat zu ernähren, so dass angenommen werden muss, dass die Fragmente verhungerten, vergleichbar zu den Ergebnissen von DE CARALT *et al.* (2007). WILKINSON (1983) beschreibt, dass der Erhaltungsstoffwechsel eines Schwammes bis zu 83 % aus gelösten Substanzen gedeckt werden kann. Zu einer umfangreichen Aufnahme von gelöstem, organischen Kohlenstoff aus dem umgebendem Wasser (DOC-Gehalt im Beckenwasser: 1 - 2 mg l^{-1}), wie von YAHEL *et al.* (2003) für die Schwammart *Theonella swinhoei* beschrieben wurde, waren alle drei eingesetzten Schwammarten offensichtlich nicht fähig, so dass sie ihren Mangel an Kohlenstoff aufgrund des geringen POC nicht ausgleichen konnten, ihre Fläche reduzierten oder abstarben.

4.1.5 Einfluss von Licht auf Schwammfragmente in künstlichem Meerwasser

Im mit Tageslichtstrahlern beleuchteten Kultivierungsbecken, mit künstlichem Meerwasser (3.2.1.8), kam es ebenfalls (siehe 4.1.4) zu einem massiven Wachstum von Algen. Trotz aller Bemühungen das Wachstum der Algen zu kontrollieren bzw. diese aus dem Becken zu entfernen, wurden immer wieder größere Algenfragmente durch die Förderpumpe des Kultivierungsmoduls (3.2.1.2) angesaugt und mit dem geförderten Wasserstrom von unten in die Fragmentträger gepresst. Die Durchflussrate des Wassers durch die Fragmentträger wurde dadurch massiv eingeschränkt und die Fragmente starben innerhalb weniger Tage ab. Der Versuch wurde daraufhin abgebrochen. Empirisch konnte aber festgestellt werden, dass funktionelle Schwämme von *A. aerophoba* und *S. domuncula* in anderen Kultivierungsbecken, die mit vergleichbaren Lichtquellen beleuchtet worden waren vitaler wirkten, als Schwämme oder Fragmente die in Dunkelheit kultiviert wurden.

Für die Untersuchung, welchen Einfluss Licht auf Schwammfragmente in künstlichem Meerwasser hat, werden für das Absterben der Fragmente in natürlichem Meerwasser die gleichen Ursachen vermutet wie jene, die das Absterben in 4.1.4 verursacht haben. Empirisch wurde festgestellt, dass der Grad der bakteriellen Bedeckung auf der Oberfläche der Fragmente in der Kultur in ASW, gegenüber den Fragmenten in natürlichem Meerwasser (4.1.4) deutlich erhöht war, so dass die Fragmente kultiviert in ASW möglicherweise nicht durch eine Nährstofflimitierung, sondern durch eine Sauerstofflimitation, oder Biofoulingprozesse abgestorben sein könnten.

4.1.6 Einfluss von Extrakten aus marinen Tieren auf das Wachstum von Schwammfragmenten

Die Absicht die in diesem Versuch verfolgt wurde war zu untersuchen, ob Schwammfragmente von *A. polypoides*, *S. domuncula* und *S. massa* mit einem Komplexmedium (RPMI bzw. ASW, 3.2.1.9), angereichert mit einem Extrakt aus *Loligo* sp. (bzw. ohne Extrakt) ernährt werden können. Die Veränderung der Fragmentfläche, aufgeschlüsselt nach Art und verwendetem Kulturmedium, sind in Abb. E 8 - E 10 dargestellt.

Einem leichten Anstieg der Fläche der *A. polypoides*-Fragmente auf 160 % in RPMI+E innerhalb der ersten 14 Tage Versuchsdauer, folgte eine nahezu stationäre Phase bis zum Versuchsende (nach 140 Tagen).

In RPMI und ASW+E nahm die Fragmentfläche nur um ~ 20 % zu und veränderte sich bis zum Ende des Versuchs kaum (Abb. E 8). Die Schnittkanten der Fragmente rundeten sich leicht nach wenigen Tagen ab und zeigten die einsetzende Heilung der durch Fragmentierung hervorgerufenen Verletzung an. Lediglich in der Kontrolle (ASW) nahm die Fläche der Fragmente ab und betrug nach 140 Tagen nur noch ~ 20 % der Initialgröße der eingesetzten Fragmente. Nur ein *A. polyoides*-Fragment in sterilfiltriertem ASW verendete während der Versuchsdauer.

Bei den Fragmenten von *S. domuncula* kam es zur einer sehr ähnlichen Entwicklung der Fragmentfläche (Abb. E 9). Innerhalb der ersten 2 Wochen Kultivierung in den vier Medien, kam es zu einer stetigen Zunahme der Fragmentfläche, speziell der Fragmente in ASW+E. Die Fragmentfläche nahm innerhalb von vierzehn Tagen um 100 % zu. Ein Abrunden der Schnittkanten blieb aus und es konnten keine Anzeichen von Anwachsen bzw. Festheften der Fragmente an den Trägeroberflächen beobachtet werden.

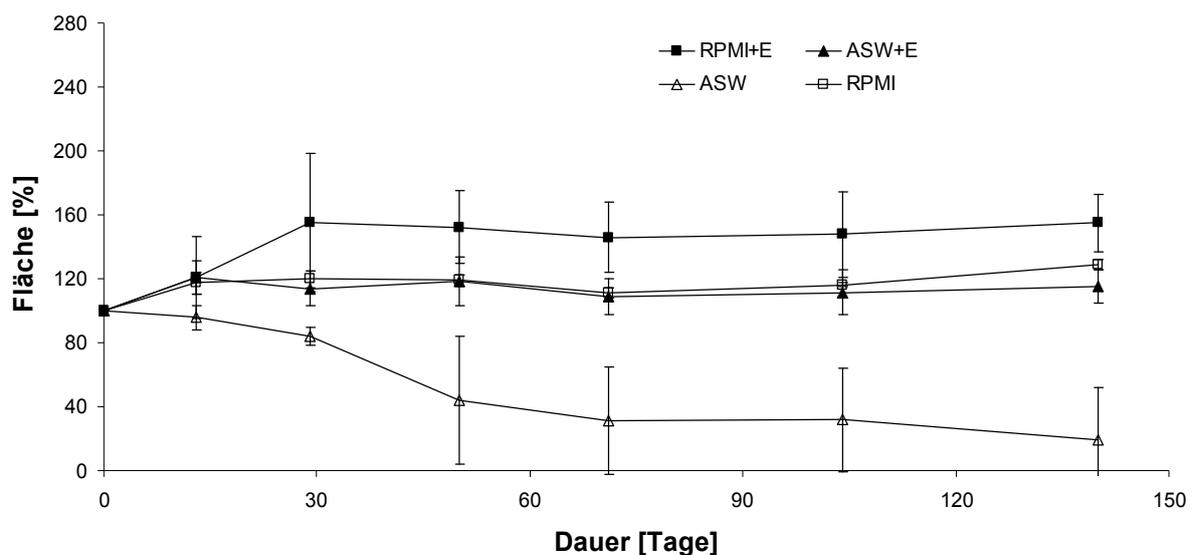


Abb. E 8: Veränderung der Fläche der *A. polyoides*-Fragmente in den verschiedenen Kulturmedien über die Kultivierungsdauer (140 Tage). Anzahl eingesetzte Schwammfragmente je Medium, N = 3.

In RPMI+E und RPMI war die Flächenzunahme geringer und lag bei ca. 50 % gegenüber dem Ausgangswert. Dieser Wert stieg bis zum Versuchsende nur noch sehr leicht, um 10 %, auf 160 % Fragmentfläche an. Die Fläche der Fragmente in der Kontrolle (ASW) nahm zu Beginn des Versuchs leicht zu, im weiteren Verlauf kam es zu einer Reduktion der Fragmentfläche um bis zu 90 %. Nach ~ 10 Wochen waren alle *S. domuncula*-Fragmente in sterilfiltriertem ASW abgestorben.

Bei den *S. massa*-Fragmenten konnte eine starke Flächenzunahme innerhalb von 10 - 14 Tagen Kultivierung in allen vier Medien festgestellt werden (Abb. E 10). Die größte Zunahme trat bei den Fragmenten die in RPMI+E kultiviert wurden auf, die ihre Fläche innerhalb dieses kurzen Zeitraums mehr als verdoppelten (+ 110 %). Dieser Wert blieb bis zum Versuchsende nahezu gleich. Auch in RPMI und ASW+E war eine Flächenveränderung auf ~ 180 bzw. 150 % feststellbar, wobei für ASW+E nach 140 Tagen Kultivierungsdauer nur noch ein Zuwachs von 20 % auf ~ 200 % zu verzeichnen war. In der Kontrolle stieg der Wert für die Fragmentfläche anfänglich auf ~ 120 % an, nahm aber im weiteren Verlauf wieder ab. Zum Ende des Versuchs hatten die *S. massa*-Fragmente in sterilfiltriertem ASW ihre Fläche gegenüber dem Ausgangswert durchschnittlich um ~ 40 % reduziert, ein Fragment war abgestorben.

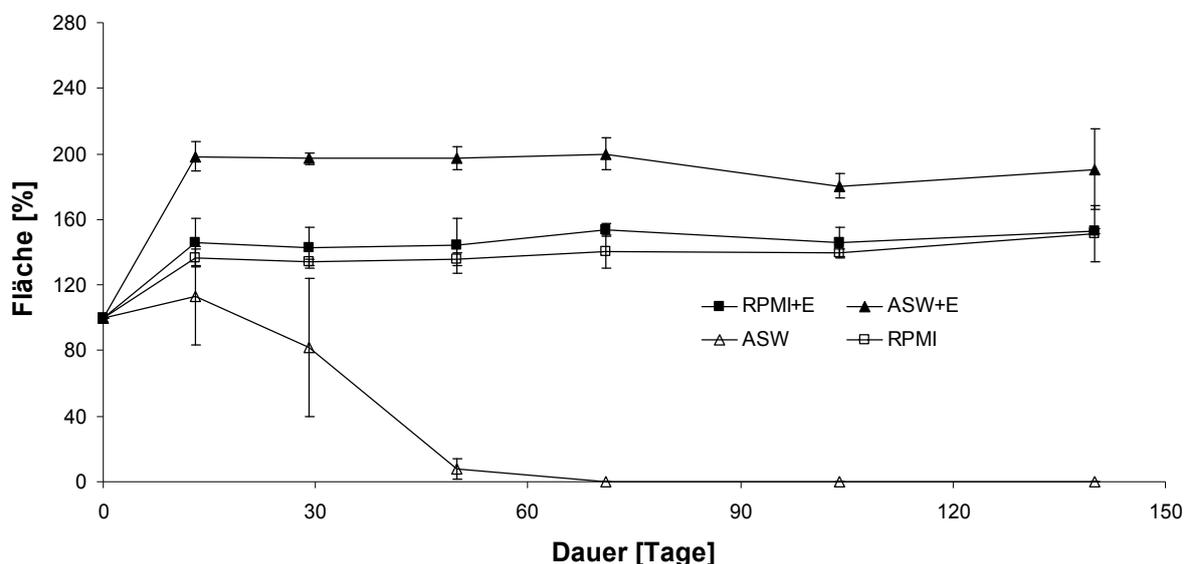


Abb. E 9: Veränderung der Fläche der *S. domuncula*-Fragmente in den verschiedenen Kulturmedien über die Kultivierungsdauer (140 Tage). Anzahl eingesetzter Schwammfragmente je Medium, N = 3.

Die Messungen des DOC-Gehalts der einzelnen Medien, jeweils als Doppelbestimmung gemessen, ergaben Werte für RPMI+E = 6,6 mg ml⁻¹, RPMI = 6,2 mg ml⁻¹, ASW+E = 1,1 mg ml⁻¹ und ASW ~ 0,7 mg ml⁻¹. Der Extrakt aus *Loligo* sp. hatte einen DOC-Gehalt von ~ 0,4 mg ml⁻¹. Teilweise kam es zu einer deutlichen Abnahme des DOC-Gehalts in den Medien innerhalb eines Tages. Eine exakte Quantifizierung der DOC-Aufnahme bzw. des DOC-Verbrauchs war nicht möglich, denn es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Abnahme des DOC-Gehalts der Medien durch einen Kohlenstoffverbrauch der Fragmente, oder durch die schwammassoziierten Mikroorganismen erfolgte.

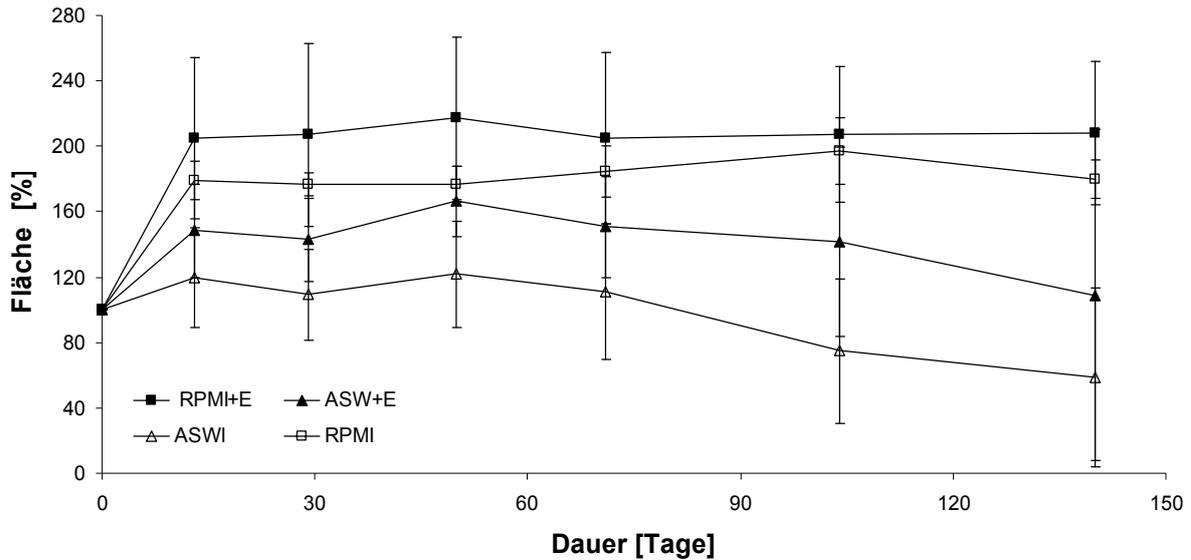


Abb. E 10: Veränderung der Fläche der *S. massa*-Fragmente in den verschiedenen Kulturmedien über die Kultivierungsdauer (140 Tage). Anzahl eingesetzter Schwammfragmente je Medium, N = 3.

Im Versuch (3.2.1.9), ob sich Schwammfragmente von *A. polypoides*, *S. domuncula* und *S. massa* mit RPMI-Komplexmedium, bzw. ASW, angereichert mit einem Extrakt aus *Loligo* sp. ernähren lassen wurde deutlich, dass die Fragmente DOC als Kohlenstoffquelle aufnehmen und verwerten konnten und über die Versuchsdauer von 140 Tagen nicht abstarben. In den Kultivierungsmedien RPMI+E, RPMI und ASW+E, in denen die Fragmente der drei Schwammarten kultiviert wurden, nahm die Fläche der Fragmente innerhalb der ersten 2 - 4 bzw. 5 Wochen Versuchsdauer stark zu (Abb. E 8 - E 10). Dieser Abschnitt wurde gefolgt von einer stagnativen Phase, in der sich die Fragmentfläche kaum noch veränderte. Die Fragmente begannen sich nach dem Einsetzen durch Formveränderung und planare Auswüchse an der Glasträgeroberfläche festzuheften und ihre Fläche auszudehnen, wobei speziell bei den *S. domuncula*-Fragmenten die Fragmentdicke reduziert wurde (Abb. E 3). Diese Veränderungen zeigten scheinbar den beginnenden Heilungsprozess an, der mit einer Formveränderung (abflachen) verbunden ist, woraus eine Flächenzunahme resultierte. Daher ist davon auszugehen, dass die anfängliche Flächenzunahme (Abb. E 8 - E 10) vermutlich nur eine Adaptation der Fragmente gegen den Anpressdruck, d.h. dem Druck durch den die Fragmente anfänglich nach dem Einsetzen in den Trägern festgehalten werden, oder eine andere Form der Adaptation anzeigt und kein „echtes“ Wachstum darstellt.

Diese Vermutung wird durch die Werte für die spezifischen Wachstumsraten der Fragmente je nach Art und Medium unterstützt, die nach anfänglich hohen Werten von $0,5 \text{ d}^{-1}$ sehr stark abnahmen und schon nach vier Wochen nahe Null lagen wodurch angezeigt wurde, dass kein Wachstum bzw. keine Flächenzunahme stattfand. CAMACHO *et al.* (2006a, b) beobachteten in vergleichbaren Versuchen mit *Crambe crambe*, kultiviert in RPMI+E, eine ähnliche Entwicklung. Innerhalb der ersten sieben Wochen war eine Tendenz zur Flächenzunahme bei den Fragmenten zu verzeichnen, gefolgt von einer nahezu stationären Phase und anschließender Flächenreduktion nach ~ 100 Tagen Kultivierungsdauer. Des Weiterem traten bei CAMACHO *et al.* (2006a, b) im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Versuch 3.2.1.9, in RPMI-Medium ohne Extrakt keinerlei Anzeichen von Wachstum auf, wodurch angezeigt wird, dass Fragmente ohne Extraktzusatz schlechter wachsen als mit. Durch Anreicherung des RPMI-Medium mit essentiellen Aminosäuren, Makro- und Mikronährelementen, sowie Glucose sollten im Vergleich mit der Zusammensetzung des natürlichen Meerwassers alle relevanten Nahrungsbestandteile enthalten sein. Scheinbar fehlten dem Kulturmedium mit hohem DOC-Gehalt in Versuch 3.2.1.9 aber ein oder mehrere Bestandteile für ein nachhaltiges Wachstum der *A. polypoides*, *S. domuncula*- und *S. massa*-Fragmente. Welcher Nahrungsbestandteil für die Ernährung bzw. das Wachstum der verwendeten Schwammarten essentiell ist und der in den getesteten Medien fehlte, blieb unklar. Es wäre denkbar, dass freie DNA, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, PUFA's, oder Chelatbildner, die im Meerwasser enthalten sind, im Medium fehlten. Auch ein stark verändertes Verhältnis von Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphat im Kultivierungsmedium, bezeichnet als Redfield-Verhältnis (REDFIELD *et al.* 1963), könnte für das ausbleibende Wachstum der Fragmente verantwortlich sein, wie von HATCHER (1994) beschrieben. Weiterhin könnte das verringerte Wachstum der Fragmente nach 140 Tagen (Abb. E 8 - E 10) mit einer zunehmenden Transportlimitierung durch die steigende Fragmentgröße zusammenhängen, so dass der Transfer von Nahrung und Sauerstoff in tiefere Gewebeschichten der Fragmente eingeschränkt worden sein könnte, so dass die spezifische Wachstumsrate der Fragmente abnimmt, wie von OSINGA *et al.* (1999a) und HOFFMANN *et al.* (2005) beschrieben wurde.

4.1.7 Ernährung von Schwammfragmenten mit einem Komplexmedium

Nachdem festgestellt worden war, dass eine Ernährung von Schwammfragmenten in RPMI-Medium und Extrakt aus *Loligo* sp. (4.1.6) möglich, aber für ein nachhaltiges Wachstum nicht adäquat war wurde untersucht, ob sich Schwammfragmente durch die Verwendung von partikulärem Krebs- und Fischfutter, sowie Ethanol ernähren lassen. Die Ergebnisse für die Wachstumsrate und die Veränderung der Fragmentfläche je Schwammart und Kulturmedium sind in Abb. E 11 - E 13 dargestellt. Im Kultivierungsbecken I (3.1.2) verursachte die Zugabe von 1 g partikulärem Krebsfutter und 10 ml Ethanol Woche⁻¹ auf ~ 200 l Wasser einen kurzfristigen Anstieg des DOC-Gehalts, der sich nach vollständiger Durchmischung des Wasservolumens auf ~ 3,5 mg l⁻¹ einpegelte. Das bedeutet, ~ 61 % des DOC im Wasser wurden durch das Krebsfutter eingebracht und ein Drittel durch das zugesetzte Ethanol. Wird aus Literaturwerten (OSINGA *et al.* 1999a) für den Sauerstoffverbrauch der eingesetzten Schwammarten (*Axinella* sp.: 0,56 µmol O₂ g⁻¹ FG h⁻¹; *S. domuncula*: 0,35 µmol O₂ g⁻¹ FG h⁻¹ und *S. massa*: 1,02 µmol O₂ g⁻¹ FG h⁻¹), und dem Feuchtgewicht der Schwammfragmente der theoretische Kohlenstoffverbrauch Woche⁻¹ berechnet, war im Beckenwasser ca. das 30-fache der benötigten Menge Kohlenstoff aller eingesetzten Schwammfragmente enthalten.

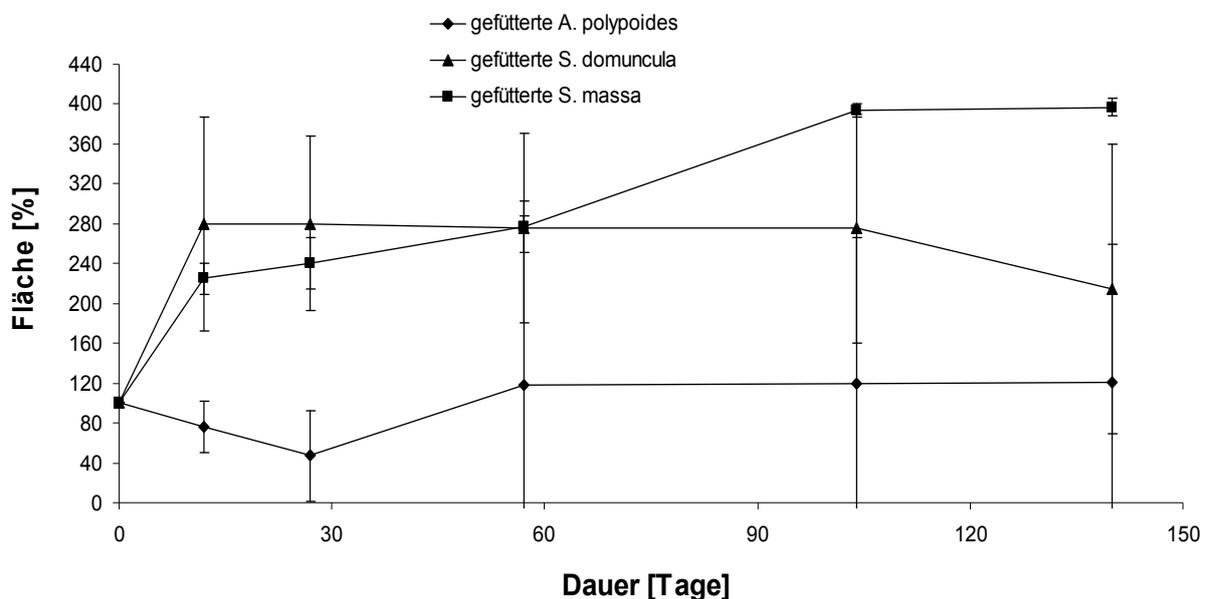


Abb. E 11a: Flächenveränderung der mit Krebsfutter und Ethanol gefütterten *A. polypoides*-, *S. domuncula*- und *S. massa*-Fragmente, in Kultivierungsbecken I, über die Dauer der Kultivierung (140 Tage). Anzahl eingesetzte Fragmente je Schwammart: *A. polypoides* = 4, *S. domuncula* = 3, *S. massa* = 3.

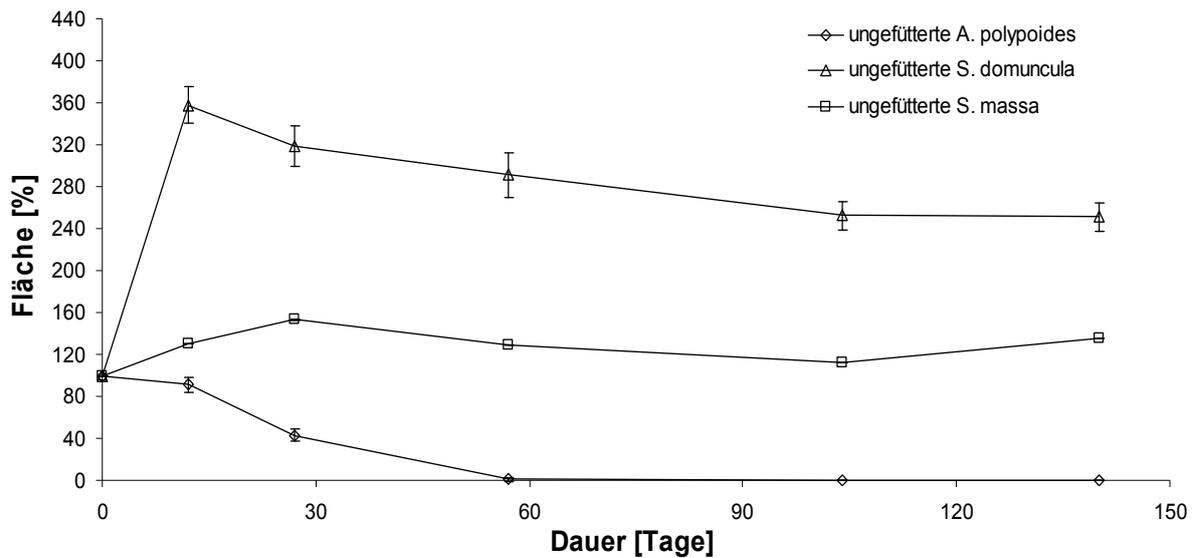


Abb. E 11b: Flächenveränderung der *A. polypoides*-, *S. domuncula*- und *S. massa*-Fragmente, in Kultivierungsbecken J ohne zusätzliche Fütterung (Kontrolle), über die Dauer der Kultivierung (140 Tage). Anzahl eingesetzte Fragmente je Schwammart: *A. polypoides* = 4, *S. domuncula* = 3, *S. massa* = 3.

Die Fläche der mit partikulärer Nahrung und Ethanol gefütterten *S. massa*-Fragmente nahm während der gesamten Versuchsdauer stetig zu. Die Fragmente hatten zu Versuchsende ihre Fläche um > 300 % vergrößert (Abb. E 11a). Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass während sich die Fragmentfläche vergrößerte, die orange Färbung der Fragmente abnahm und diese zum Versuchsende relativ blass wirkten. Die *S. domuncula*-Fragmente zeigten nach anfänglicher Zunahme auf ~ 280 % ein leichtes Abflachen der Kurve für die Flächenänderung und hatten zum Versuchsende noch eine Zunahme von ~ 100 % zu verzeichnen. Innerhalb von vierzehn bis zwanzig Tagen nach Versuchsbeginn zeigten die *A. polypoides*-Fragmente eine Flächenabnahme von ~ 50 %. Nach dieser Zeit nahmen die Fläche wieder zu und die Fragmente zeigten bei Versuchsende eine ~ 20 %ige Zunahme gegenüber der Ausgangsfläche (Abb. E 11a). Die Fläche der *S. domuncula*-Fragmente in der ungefütterten Kontrolle stieg innerhalb von ca. 14 Tagen sprunghaft an und erreichte einen Spitzenwert von ~ 260 % Zuwachs gegenüber der Initialgröße. Dieser Wert sank bis zum Versuchsende wieder, so dass nach 140 Tagen Kultivierung noch eine Flächenzunahme von 160 % zu verzeichnen war (Abb. E 11b). Die *S. massa*-Fragmente zeigten nach anfänglichem leichten Anstieg der Fragmentfläche innerhalb von vier Wochen auf ~ 160 % ein Abflachen der Verlaufskurve für die Flächenveränderung und hatten zum Versuchsende noch einen Flächenzuwachs von ~ 30 % gegenüber der Ausgangsfläche zu verzeichnen.

Die ungefütterten Fragmente von *A. polypoides* reduzierten ihre Fläche innerhalb von zwei Wochen nur leicht, gefolgt von einer starken Flächenabnahme und Gewebedegeneration, so dass alle eingesetzten Fragmente nach acht Wochen abgestorben waren (Abb. E 11b).

Die Werte für die spezifische Wachstumsrate der gefütterten *A. polypoides*-Fragmente schwankten während der Kultivierung sehr stark und lagen bei $-0,02 \text{ Tag}^{-1}$ (12 Tage nach Versuchsbeginn). Sie stiegen anschließend stetig an und erreichten nach etwa acht Wochen Kultivierungsdauer einen Maximalwert von $0,02 \text{ Tag}^{-1}$, der danach wieder abnahm. Nach 104 Tagen betrug der Wert für die spezifische Wachstumsrate Null. Dagegen lag der Wert für die spezifische Wachstumsrate der ungefütterten *A. polypoides*-Fragmente über die gesamte Kultivierungsdauer im negativen Bereich und schwankte zwischen $-0,005$ und $-0,025 \text{ Tag}^{-1}$, d.h. die Fläche der ungefütterten Fragmente schrumpfte während der gesamten Versuchsdauer permanent. Für *S. domuncula* sanken die Werte der spezifischen Wachstumsrate der gefütterten Fragmente von anfänglich $0,21 \text{ Tag}^{-1}$ innerhalb von vier Wochen auf den Wert Null und änderten sich bis Versuchsende nicht mehr. Der Wert der spezifischen Wachstumsrate der ungefütterten *S. domuncula*-Fragmente sank ebenfalls innerhalb von vier Wochen, von $0,15$ auf $-0,001 \text{ Tag}^{-1}$. Der Wert stieg im weiteren Verlauf wieder geringfügig, näherte sich dem Wert Null stark an, blieb aber bis Versuchsende unverändert im negativen Bereich. Das bedeutet, dass die gefütterten Fragmente durchschnittlich geringfügig wuchsen, im Kontrast dazu die ungefütterten Fragmente schrumpften. Der Wert für die spezifische Wachstumsrate der *S. massa*-Fragmente betrug fünf Wochen nach Versuchsbeginn $0,105 \text{ Tag}^{-1}$. Er sank innerhalb von sieben Wochen auf $0,008 \text{ Tag}^{-1}$, blieb aber über die gesamte Versuchsdauer hinweg im positiven Bereich. Im Gegensatz dazu sank die spezifische Wachstumsrate der ungefütterten Fragmente von $0,025 \text{ Tag}^{-1}$ nach acht Wochen in Kultivierung auf $-0,005 \text{ Tag}^{-1}$ und blieb für die restliche Versuchsdauer (ca. 90 Tage) im negativen Bereich.

Es wurde versucht Schwammfragmente mit partikulärem Futter und Ethanol zu ernähren (3.2.1.10), um eine adäquate Ernährung zu realisieren. Die Zudosierung von verschiedenen Supplementen, z.B. Zuckerwasser, Honig oder Ethanol ins Beckenwasser, um stärkere Farben, Wachstum und höhere Vitalität bei niederen Tieren, z.B. Anthozoa zu erzielen, ist aus der Aquaristik bekannt (MRUTZEK & KOKOTT 2004, SCHUMACHER, persönl. Mitteilung) und versprach auch für den Einsatz bei Schwämmen Erfolg. Das Schwämme neben der Aufnahme und Verwertung von partikulärer Nahrung auch die Fähigkeit zur Aufnahme von gelösten Substanzen aus dem umgebendem Medium haben, wurde von OSINGA *et al.* (2001, 2003), BELARBI *et al.* (2003), YAHEL *et al.* (2003) und CAMACHO *et al.* (2006a, b) beschrieben.

Bei den in der Untersuchung verwendeten Nahrungssubstanzen, Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol, konnte nur für *S. massa* eine nachhaltige Flächenzunahme von ~ 300 % über die Versuchsdauer von 140 Tagen erzielt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass zumindest für diese Schwammart alle essentiellen Nahrungsbestandteile im Kulturmedium für ein stetiges Wachstum vorhanden waren. Für *A. polypoides* und *S. domuncula* muss angenommen werden, dass im Versuch Schwammfragmente in offener Aquarienhaltung zu kultivieren und mit Krebs-/Fischfutter und Ethanol zu versorgen, mindestens ein oder mehrere essentielle Bestandteile im Medium für ein nachhaltiges Wachstum der Fragmente fehlten, so dass die Fragmente von *A. polypoides* nach acht Wochen abstarben (Abb. E 11b). Welcher Bestandteil des Mediums das gesteigerte Wachstum der gefütterten *S. massa*-Fragmente, im Vergleich mit *A. polypoides* und *S. domuncula* verursacht hat, konnte nicht geklärt werden.

Die Flächenzunahme bei *S. domuncula* (Abb. E 11a) und bei *A. polypoides*, nach vier Wochen in Kultivierung, ist vermutlich ähnlich wie bei den Ergebnissen in Versuch 4.1.6 nur als eine Art der Adaptation der Fragmente gegen den Anpressdruck nach dem Einsetzen in die Fragmentträger anzusehen. Diese Vermutung wird durch die Werte für die spezifischen Wachstumsraten der Fragmente je nach Art und Medium untermauert, die schon nach zwei Wochen bei Null lagen, wodurch angezeigt wurde, dass kein Wachstum stattfand. Die gleiche Vermutung trifft auch für die Fragmente der drei Schwammarten in der ungefütterten Kontrolle zu. Die anfängliche Flächenzunahme bei *S. domuncula* und *S. massa* (Abb. E 11b) wird ebenfalls nur als Adaptation der Fragmente an die Kultivierungsbedingungen nach dem Einsetzen in die Fragmentträger angesehen (4.1.6), denn nach zwei bis vier Wochen stagnierte die Flächenzunahme der Fragmente, bzw. die Fläche nahm ab.

4.1.7.1 Ernährung von *S. massa*-Fragmenten mit einem Komplexmedium

In einer Fortführung von Versuch (3.2.1.10, 4.1.7) wurden ausschließlich Fragmente von *S. massa* in Becken I (3.1.2) mit partikulärem Krebs- und Fischfutter und Ethanol über eine Dauer von ~ 400 Tagen ernährt, bzw. in Becken J als Kontrolle, ungefüttert, ~ 320 Tage kultiviert. Die Veränderung der Fragmentfläche der gefütterten und der ungefütterten Fragmente sind in Abb. E 12a graphisch dargestellt. Für eine bessere Visualisierung der Ergebnisse werden Fotos der gefütterten Fragmente zu den in Abb. E 12a angegebenen Zeitpunkten (A - E), bzw. für die ungefütterten Fragmente (a - e) gezeigt.

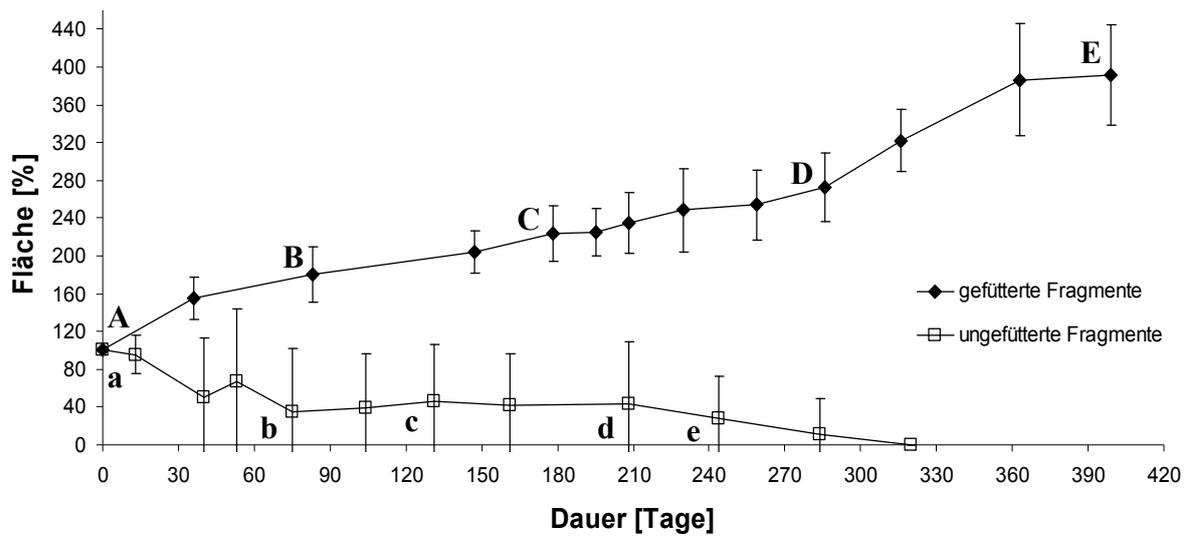


Abb. E 12a: Veränderung der Fläche der *S. massa*-Fragmente in Kultivierungsbecken I (gefüttert mit Krebsfutter und Ethanol) und in Kultivierungsbecken J (Kontrolle, ohne Fütterung).

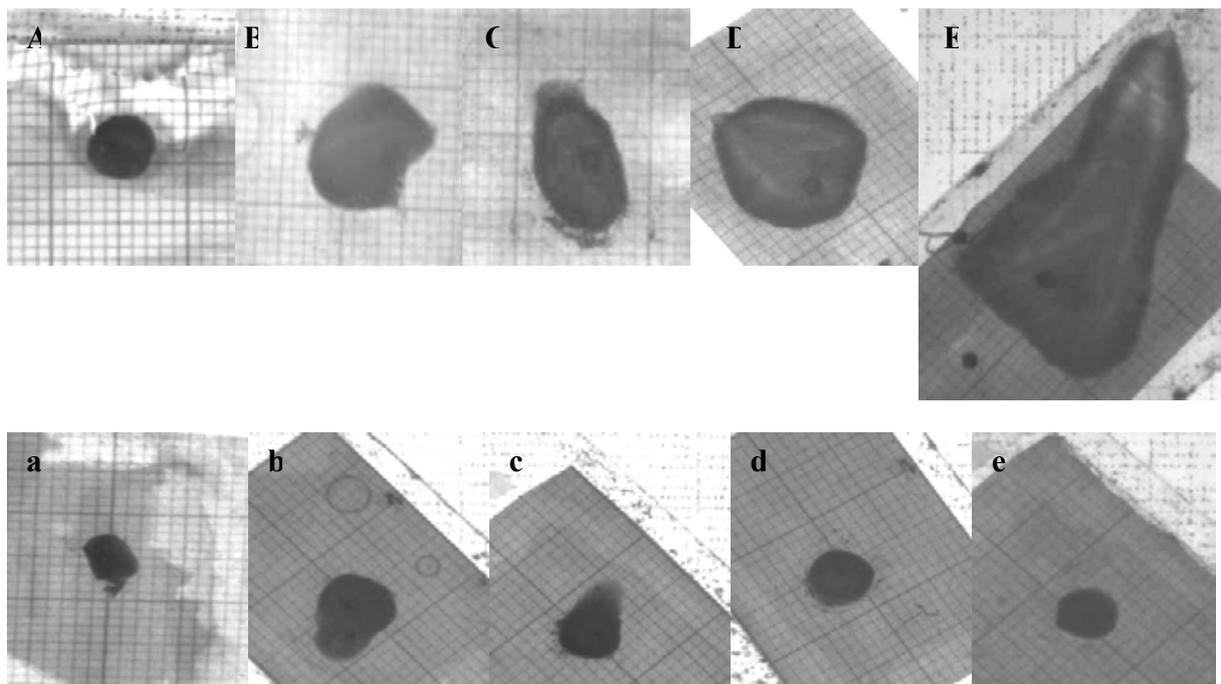


Abb. E 12b: Veränderung der Fläche der mit Krebsfutter und Ethanol gefütterten *S. massa*-Fragmente, in Becken I (am Beispiel von Fragment Sm 3, Reihe A-E) und der ungefütterten Fragmente, in Becken J (am Beispiel von Sm 2_01, Reihe a-e). Im Bildhintergrund zu sehen, dass in die Fragmentträger eingeklebte Millimeterpapier, als Maßstab.

Alle gefütterten *S. massa*-Fragmente vergrößerten während der Versuchsdauer ihre Fläche (Abb. E 12b), begannen ihre Gewebe- und innere Organisationsstruktur zu verändern und bildeten ein aquiferes System, mit deutlich sichtbarem Osculum aus (Abb. E 13).

Bis zum Versuchsende, nach ~ 400 Tagen, hatten die gefütterten *S. massa*-Fragmente ihre Fläche um ~ 300 % vergrößert (Abb. E 12a, b). Im Gegensatz dazu begannen die ungefütterten Fragmente zu schrumpfen und nach 5 Wochen Kultivierungsdauer hatte sich die durchschnittliche Fragmentfläche auf ~ 60 % verringert. Nach ca. 11 Monaten Kultivierung waren alle ungefütterten *S. massa*-Fragmente abgestorben (Abb. E 12a).

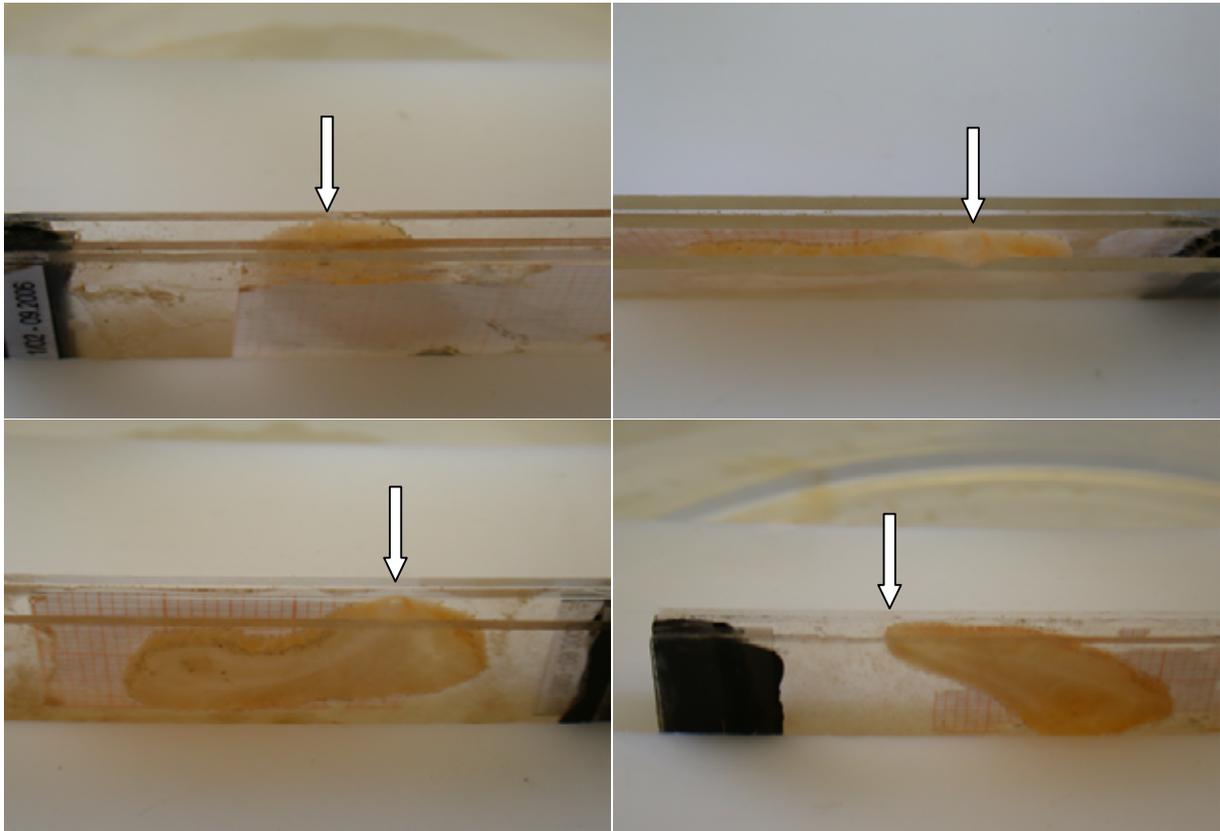


Abb. E 13: Fotos der mit partikulärem Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol ernährten *S. massa*-Fragmente in Kultivierungsbecken I, nach 336 Tagen Kultivierung. Fragment Sm 1 (oben links), Sm 2 (oben rechts), Sm 3 (unten links), Sm 4 (unten rechts). Durch Pfeile gekennzeichnet sind die Oscula, welche die Fragmente ausgebildet haben. Im Gewebe der Fragmente sichtbar, sind die Kanäle des ausgebildeten aquiferen Systems.

Der Wert für die spezifische Wachstumsrate der mit Krebsfutter und Ethanol gefütterten *S. massa*-Fragmente nahm von Beginn des Versuchs an kontinuierlich ab. Nach ~ 210 Tagen betrug der Wert Null (Abb. E 14), nahm nach weiteren 7 Wochen wieder leicht zu und blieb über die gesamte Versuchsdauer stets im positiven Bereich. Der Wert der spezifischen Wachstumsrate der ungefütterten Fragmente (Abb. E 14) bewegte sich während der Versuchsdauer sowohl im positiven und im negativen Bereich, wobei er vorwiegend im negativen Bereich lag. Lediglich nach ~ 50 Tagen war ein sprunghaft erhöhter positiver Wert für die spezifische Wachstumsrate zu verzeichnen. Anschließend fiel der Wert wieder stark ab und lag für die restliche Versuchsdauer permanent im negativen Bereich.

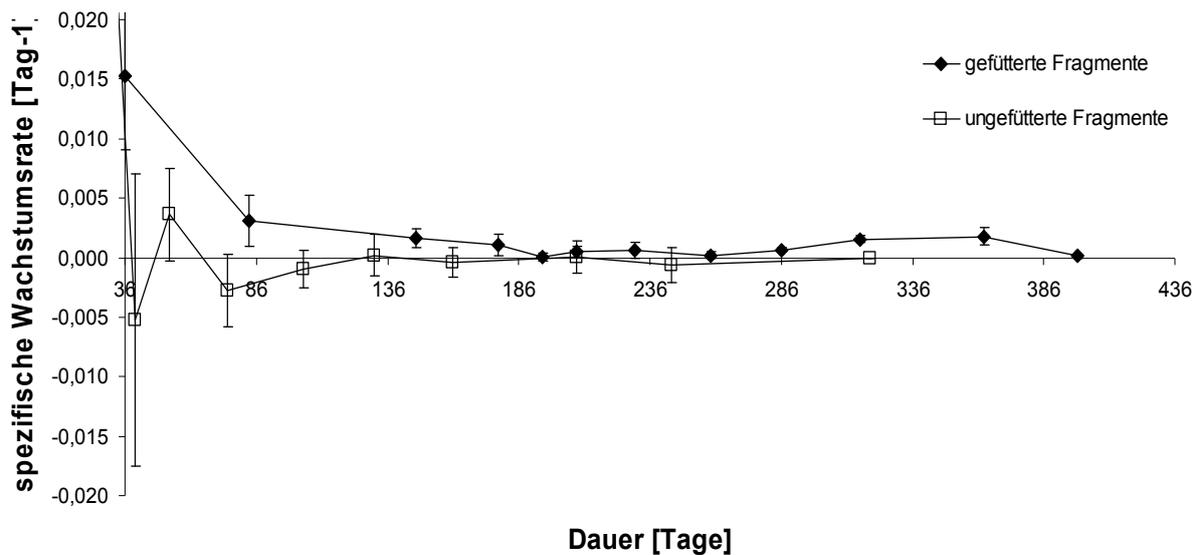


Abb. E 14: Spezifische Wachstumsraten der mit partikulärem Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol ernährten *S. massa*-Fragmente, in Kultivierungsbecken I und der ungefütterten Fragmente, in Kultivierungsbecken J (Kontrolle), über die Versuchsdauer (399 bzw. 312 Tage).

In Kultivierungsbecken I (3.1.2), mit einer im Bodengrund lebenden, endobenthischen Gemeinschaft, naturähnlicher Strömung, Temperatur und Beleuchtung, wurden Fragmente von *S. massa* über ~ 400 Tagen kultiviert. Es wurde ein nachhaltiger Flächenzuwachs der Fragmente von mehr als 300 % a⁻¹ festgestellt, wodurch dieses Wachstum verursacht wurde blieb aber unklar. Eine detaillierte Bilanzierung des Kohlenstoffverbrauchs im Kultivierungsbecken war nicht realisierbar. Es war nicht eindeutig feststellbar, wie viel Kohlenstoff (POC und DOC) von den Schwammfragmenten und wie viel von anderen im Becken lebenden Organismen, z.B. Bakterien, thekaten Foraminiferen, Polychaeten oder Actinien verwertet wurde. Das als DOC-Quelle zudosierte Krebsfutter und Ethanol wird dabei möglicherweise nicht direkt von den Schwammfragmenten aufgenommen, sondern von Mikroorganismen der Infauna oder von schwammassozierten Bakterien, wie von BOROWITZKA *et al.* (1988), WILKINSON & GARRONE (1980) oder YAHEL *et al.* (2003) für verschiedene Schwammarten vermutet wurde. Durch die Aufnahme und Verwertung des Krebsfutters und Ethanols nehmen die Mikroorganismen aller Wahrscheinlichkeit nach in ihrer Abundanz stark zu und werden von den Schwammfragmenten als Nahrungsquelle genutzt. Durch die Digestion der Mikroorganismen sind die Fragmente in der Lage, größere Mengen Kohlenstoff aufzunehmen und zusätzlich ihren Stickstoff- und Phosphatbedarf zu decken, wie von MALDONADO & YOUNG (1988) beschrieben wurde.

Zudem könnte der Bedarf an Vitaminen, PUFA's und anderen Substanzen gedeckt werden, welche die Schwammfragmente nicht selber synthetisieren können (WILKINSON & FAY 1979, DIAZ 1997, OSINGA *et al.* 1999a).

4.1.8 Wachstum von Schwammfragmenten in Abhängigkeit der Ernährung mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen

Alle in der Untersuchung eingesetzten *A. aerophoba*- und *S. domuncula*-Fragmente, ob sich diese mit gelösten Substanzen und partikulärer Nahrung versorgen lassen, waren nach < 14 Tagen abgestorben. Es wurde festgestellt, dass sich bei *A. aerophoba*-Fragmenten aufgrund einer als weißlicher Überzug sichtbaren mikrobiellen Infektion, das Pinacoderm dunkelbraun bis schwarz verfärbte und vom restlichen Gewebe ablöste, woraufhin die Fragmente abstarben. Bei den *S. domuncula*-Fragmenten hingegen konnten keine sichtbaren Anzeichen einer Infektion festgestellt werden. Allerdings starben auch diese Fragmente nach umfassender Gewebedegeneration und -reduktion, die in der Randzone der Fragmente begann und die sich ins Innere fortsetzte, nach weniger als vier Wochen ab. Eine Vermutung, um das Absterben der Fragmente zu erklären besteht darin, dass es durch eine starke mikrobielle Kontamination, des mit verschiedenen Substanzen angereicherten Komplexmediums (3.2.1.11), zum Absterben der Fragmente gekommen sein könnte.

Die Zugabe von 100 µl Ethanol Woche⁻¹ ergab in Becken H₁ - H₇ einen DOC-Gehalt von ~ 3,43 mg C l⁻¹. Wird aus Literaturwerten für den O₂-Verbrauch (OSINGA *et al.* 1999a) und dem Feuchtgewicht der Schwammfragmente der Kohlenstoffverbrauch berechnet, entsprach die im Medium enthaltene Menge DOC dem 13,5-fachen der theoretisch benötigten Menge Kohlenstoff. Die parallel als Doppel- bzw. Dreifachbestimmung durchgeführten Zellzahlbestimmungen, ergaben die in Tab. E 2 angegebenen, gemittelten Werte. In der Untersuchung, Schwammfragmente mit verschiedenen partikulären Futterorganismen sowie Ethanol und anderen gelösten Substanzen zu ernähren (3.2.1.11), verursachte deren Zugabe in den Modulbecken H₁ - H₇ (3.1.2) keinen messbaren Anstieg der Wachstumsrate der Schwammfragmente.

Tab. E 2: Gemessene Zellzahlen [Zellzahl ml⁻¹] in den einzelnen Modulbecken, in die *Synechococcus* sp. und verschiedene, gelöste Substanzen zudosiert wurden.

Modulbecken	Zellzahl [Zellen ml ⁻¹]
H ₁	2,03 * 10 ⁵
H ₂	2,79 * 10 ⁵
H ₃	1,81 * 10 ⁵
H ₄	3,67 * 10 ⁵
H ₅	5,16 * 10 ⁶
H ₆	7,30 * 10 ⁶
H ₇	4,08 * 10 ⁶
H ₈	7,90 * 10 ⁴

Obwohl die Werte für den DOC im Beckenwasser um ein Vielfaches höher lagen (13,5x) als im natürlichen Habitat (1 - 3 mg l⁻¹), konnte kein nachhaltiges Wachstum der Fragmente erzielt werden. Es fehlten vermutlich ein, oder mehrere, essentielle Bestandteile im Medium für ein dauerhaftes Wachstum der Schwammfragmente. Durch eine starke Erhöhung des DOC im Beckenwasser, konnte kein gesteigertes Wachstum von Schwammfragmenten hervorgerufen werden. Es wäre daher denkbar, dass mit dem zudosierten, partikulären Krebs- und Fischfutter (3.2.1.10) mehrere Substanzen ins Beckenwasser gelangt sein könnten, die essentielle Faktoren für das Wachstum der *S. massa*-Fragmente (4.1.7, 4.1.7.1) darstellen. Möglich wäre auch, dass ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren für das Wachstum der *S. massa*-Fragmente verantwortlich war, das in Versuch 3.2.1.11 nicht gegeben war. Weiterhin wäre denkbar, dass es in Becken I (3.1.2) durch die endobenthische Gemeinschaft zu Abbauprozessen bzw. zu Syntheseprozessen von organischen Verbindungen gekommen sein könnte, die ins Beckenwasser abgegeben wurden. Die freigesetzten Substanzen im Beckenwasser könnten von Mikroorganismen erneut für eine Biomassenproduktion genutzt worden sein, woraus vermutlich eine erhöhte Abundanz dieser Organismen resultierte. Diese Nahrungsquelle könnte den Schwammfragmenten (3.2.1.10) für ihre Ernährung zur Verfügung gestanden haben, so dass sie nachhaltig wuchsen. Im Modulbecken H₁ - H₈ (3.1.2) dagegen, könnte es durch das Fehlen einer endobenthischen Gemeinschaft zum Ausbleiben derartiger Synthese- bzw. Abbauprozessen, die für eine Sekundärproduktion der Mikroorganismen ausschlaggebend gewesen wären gekommen sein, so dass den Schwammfragmente die zusätzliche Nahrungsquelle für ein nachhaltiges Wachstum fehlte.

4.2 Multizelluläre Reaggregate

4.2.1 Screening nach geeigneten Schwammarten zur Herstellung von MZRA

Es sollte untersucht werden, welche Schwammarten sich zur Herstellung von MZRA eignen und ob sich die MZRA unter *ex-situ* Bedingungen dauerhaft kultivieren lassen. Das nahezu identische Spektrum der Schwammarten, die auf ihre Eignung für Fragmentierungsversuche untersucht worden waren (4.1.1), wurde auch auf ihre Eignung zur Herstellung von MZRA untersucht. Dabei stellten sich *A. polypoides* und *S. domuncula* als sehr gut geeignete Arten für die Herstellung von MZRA heraus, wohingegen andere Schwammarten als ungeeignet eingestuft wurden (Tab. E 3).

Tab. E 3: Überblick über die getesteten Schwammarten auf ihre Eignung für die Herstellung von Reaggregaten. ++ = sehr gut geeignet, + = gut geeignet, - = nicht geeignet.

Schwammart	Eignung für die Herstellung von MZRA
<i>A. aerophoba</i>	-
<i>A. polypoides</i>	++
<i>C. nucula</i>	-
<i>C. reniformes</i>	-
<i>P. ficiformis</i>	+
<i>S. domuncula</i>	++
<i>Tethya</i> sp.	-

Bei der mechanischen Dissoziation von *A. aerophoba*-Gewebe ergab sich eine getrübbte, blauviolette, Zellsuspension. Die Verfärbung beruht auf einer Reaktion des im Gewebe enthaltenen Pigments Uranidin, 3,5,8-trihydroxy-4-quinolen bei Kontakt mit Sauerstoff oder durch Druckeinwirkung (CIMINO *et al.* 1984, PROKSCH *et al.* 2006). Möglicherweise behindert diese Substanz die Bildung von MZRA, denn aus der Suspension bildeten sich auch über einen längeren Zeitraum hinweg keine MZRA, weshalb die Art für die Herstellung von MZRA als nicht geeignet eingestuft wurde. Die Schwammarten *C. nucula*, *C. reniformes* ließen sich bedingt durch ihre sehr kompakte Gewebestruktur und ihr kollagenes Skelett nicht, oder nur sehr eingeschränkt, mechanisch dissoziieren. Gewebematerial von *Tethya* sp. konnte durch die im Schwammgewebe vorhandene, fasrige Struktur ebenfalls nicht mechanisch dissoziiert werden. Deshalb wurden diese drei Arten als nicht geeignet bestimmt, um MZRA herzustellen. *Petrosia ficiformis* wurde zwar als geeignete Art für die Herstellung von MZRA bestimmt und sollte auch für Versuche verwendet werden.

Allerdings starben die funktionellen Schwämme, von denen das Ausgangsmaterial gewonnen werden sollte in der Kultivierung ab, so dass diese Art in weitere Versuche mit MZRA nicht integriert werden konnte.

Sowie das Gewebe von *A. polypoides* bzw. *S. domuncula*-Probenmaterial durch das verwendete Plastik-Küchensieb mechanisch dissoziiert wurde (3.2.2.1), ergab sich eine deutliche Trübung des CMFSW. Diese Trübung des CMFSW war bei *S. domuncula* hell-orange und bei *A. polypoides* sehr kräftig orange gefärbt. In schwach bewegten Petrischalen mit den Zellsuspensionen der jeweiligen Schwammart bildeten sich schon nach wenigen Stunden kleine, noch locker erscheinende Zell-Reaggregationen (Abb. E 15) von nicht weiter bestimmter Morphologie, deren Dichte mit zunehmender Zeit augenscheinlich zunahm. Nach 2 - 4 Tagen hatten sich aus den lockeren Zell-Reaggregationen runde bis eiförmige MZRA von ca. 0,25 - 1,4 mm Durchmesser, mit dichter Zellstruktur und rauher Oberfläche gebildet.

Die Kulturen beider Arten verhielten sich in der Abfolge der Reaggregationsschritte gleich und es konnten keine nennenswerten Unterschiede in Form oder Größe festgestellt werden. Lediglich die Färbung der entstandenen MZRA war unterschiedlich stark ausgeprägt. Die multizellulären Reaggregate von *S. domuncula* verklumpten teilweise nach einigen Tagen und bildeten einen lockeren Verband bestehend aus Einzel-MZRA (Abb. E 15), die aber untereinander keine Form von Aggregation aufwiesen und die sich nach wenigen Tagen wieder vereinzeln. Nach einer Woche hatten die MZRA beider Arten eine glatte Oberfläche ausgebildet, eine nahezu sphäroide Form angenommen und eine Größe von 1 - 2 mm erreicht. Ein Unterschied in der Entwicklung der MZRA beider Arten war nach 2 - 3 Wochen dahingehend feststellbar, dass die MZRA von *S. domuncula* weiterhin an Größe zunahm, wohingegen die *A. polypoides*-MZRA um ca. 4/5 ihrer bis dahin erreichten Größe schrumpften, anschließend aber innerhalb weniger Tage wieder auf ca. 1 mm Durchmesser anwachsen (Abb. E 15). Die in der Peripherie der MZRA vorhandenen Zellen waren hauptsächlich Pinacocyten, die dazu dienten ein primäres bzw. sekundäres Abschlußgewebe zum umgebenden Milieu zu etablieren. Die Pinacocyten konnten anhand ihrer abgeflachten, fusiformen Ausdehnung und ihres großen Nucleolus relativ leicht bestimmt werden. Die Größe der Zellen variierte dabei von 15 bis 20 µm. Während der Bildungsphase kontrahierten die MZRA und in der peripheren Randzone der sich bildenden MZRA wurde ein Saum aus abgestorbenen Zellen und Spicula festgestellt. Diese wurden vermutlich durch Zellbewegung und -umgruppierung an den Rand der MZRA verlagert und „ausgeschieden“. Innerhalb der MZRA waren größere Mengen sphärule Zellen enthalten, eine Speicherzellform für Nahrungsbestandteile.

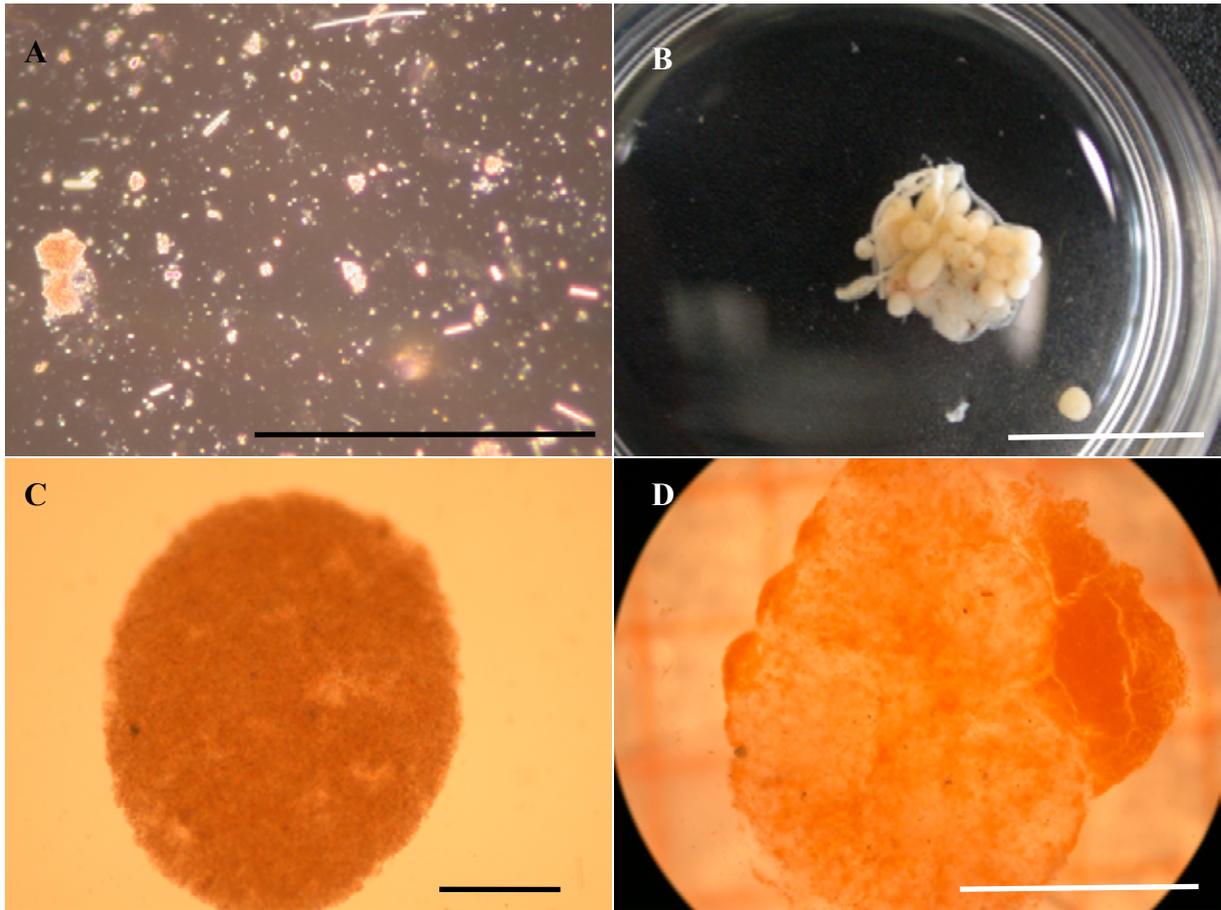


Abb. E 15: Multizelluläre Reaggregate (A) aus *S. domuncula*-zellen, ca. 6 h nach Gewebe-Dissoziation und Reaggregation der Zellen, Vergrößerung: 40x, (B) verklumpte *S. domuncula*-MZRA nach 4 - 5 Tagen Inkubation in einer Petrischale, Vergrößerung: 10x, (C) *A. polypoides*-MZRA, direkt nach dem Einsetzen in einen Objektglaträger, Vergrößerung 100x und (D) nach 4 Wochen in Kultivierung. Länge Maßstabballen: 1 cm.

Diese Zellen hatten einen Durchmesser von 40 bis 45 μm und waren durch ihre großen Vakuolen relativ leicht zu bestimmen. Weitere Zellformen hatten eine Größe von 55 bis 60 μm , wobei es sich wahrscheinlich um Archaeocyten und Amöbocyten handelte. Die einzelnen MZRA begannen sich nach vier Wochen an der Glasoberfläche der Schalen festzuheften und wurden daraufhin in Objektglaträger eingesetzt und in Kultivierungsmodulen in Modulbecken H₁ - H₈ kultiviert. In den MZRA beider Schwammarten zeigten sich nach ca. 4 Wochen kaum Anzeichen einer Differenzierung der Zellen und Ausbildung eines aquiferen Systems (Abb. E 15). Die MZRA starben innerhalb von vier bis acht Wochen in der Kultivierung ab. Ein Umstand, der für das Absterben der MZRA mitverantwortlich sein könnte war, dass die MZRA von Copepoden, Turbellarien und Nematoden, die mit dem Zellmaterial in die Probe gelangten, als Nahrung genutzt wurden, wodurch das MZRA-Gewebe dezimiert wurde. Es wurde versucht die Kontaminanten durch häufigen Mediumswechsel zu eliminieren, jedoch nur mit mäßigem Erfolg.

Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, welche Schwammarten für die Herstellung von MZRA geeignet sind. Es konnte festgestellt werden, dass *Axinella polypoides* und *S. domuncula* sehr gut für die Dissoziation von Gewebe in Einzelzellen und deren Reaggregation zu MZRA geeignet sind. Die Bildung der MZRA aus dissoziierten Zellen von *A. polypoides* und *S. domuncula* wurde dabei von der Wassertemperatur beeinflusst, bei der die MZRA kultiviert wurden. In kühleren Temperaturen von 15 °C kam es zu einer deutlich geringeren Formierung bzw. zum Ausbleiben der Bildung von MZRA. Bei 15 - 18 °C bildeten sich vital wirkende MZRA, bei höheren Temperaturen kam es dagegen nur sehr begrenzt zur Bildung von MZRA. Ab Temperaturen von mehr als 22 °C starben die dissoziierten Zellen ohne eine erkennbare Formation von MZRA ab. Für den Bildungsprozess von MZRA aus dissoziierten Schwammzellen ist es daher empfehlenswert, Wassertemperaturen von 15 - 18 °C zur Kultivierung zu verwenden. Dies könnte auch die Ausbreitung von Kontaminanten einschränken, die am Gewebe der MZRA fressen und ein Absterben der MZRA verursachen bzw. beschleunigen können. Ein Einfluss der Initialzellzahl auf die Bildungsrate, -geschwindigkeit der MZRA und deren Überleben konnte im Gegensatz zu SIPKEMA *et al.* (2003b) nicht festgestellt werden. Empirisch wurde festgestellt, dass lediglich der Anteil Pinacoderm der Gewebeprobe die dissoziiert wurde, um die Einzellsuspension zu gewinnen, einen Einfluss auszuüben schien. Je größer der Anteil Pinacoderm am dissoziierten Gewebe war, desto robuster wirkten die entstehenden MZRA.

4.2.2 Ernährung von MZRA mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen

Ein Ziel der Versuche mit multizellulären Reaggregaten (MZRA) war zu untersuchen, ob sich diese mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen ernähren lassen. Im Versuch zeigte sich bei den *A. polypoides*- und *S. domuncula*-MZRA während der Versuchsdauer von ca. 9 - 10 Wochen keinerlei Flächenveränderung und es kam nicht zur Ausbildung eines aquiferen Systems innerhalb der MZRA. Die Reaggregate begannen nach drei Wochen in Kultur ihre Gewebsdichte zu reduzieren und lösten sich nach weiteren zwei Wochen vollständig auf, so dass nur geringe Mengen an Spicula in den Trägern verblieben. Die Auflösung zeigte sich vor allem daran, dass die Oberfläche der MZRA stark zerklüftet und aufgelockert erschien und die Färbung der MZRA nur noch schwach ausgeprägt war, was auf eine Abnahme der vitalen Zellen hindeutete.

In Modulbecken H₅ (3.1.2), in dem Ethanol, Eisencitrat, Natronwasserglas und Hefeextrakt zudosiert wurden (Tab. M 2), starben die MZRA beider Schwammarten schneller ab, als in allen anderen Kultivierungsbecken. Eine mikroskopische Untersuchung zeigte eine massive Vermehrung von Mikroorganismen und Pilzen im Kultivierungsmedium, die möglicherweise das Absterben der MZRA verursacht haben könnten. Die Untersuchung wurde daraufhin abgebrochen und wiederholt. Es wurden erneut MZRA von *A. polypoides* und *S. domuncula* hergestellt. Auf den Einsatz von chemischen Agenzien wurde auch in der Wiederholung der Untersuchung verzichtet. Um eine Unterversorgung mit Nahrung und ein daraus resultierendes Absterben auszuschließen, wurden die Konzentrationen der zugesetzten gelösten Substanzen (Tab. M 2) in den Kulturmedien verdoppelt. Allerdings zeigte auch diese Veränderung der Versuchsbedingungen keine veränderten Resultate, hinsichtlich der Lebensdauer der Reaggregate. Die MZRA starben nach ca. 3 - 4 Wochen Kultivierung in den Objektglaträgern ab. Wodurch dieses Absterben verursacht wurde blieb unklar. Nach den erfolglosen Versuchen MZRA mit partikulärer und gelöster Nahrung zu kultivieren, wurden die Versuche eingestellt.

Das Scheitern der Versuche, MZRA mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen zu ernähren, könnte mehrere Ursachen haben. Durch das Einsetzen in Objektglaträger (Abb. M 10) zur Kultivierung, könnte die Ausbreitungsmöglichkeit der MZRA limitiert, die Fähigkeit zur Ausbildung eines aquiferen Systems und damit der Nahrungserwerb eingeschränkt worden sein. Diese Einschränkung könnte das verhältnismäßig rasche Absterben der hergestellten MZRA von *A. polypoides* und *S. domuncula* nach 2 - 3 Monaten verglichen mit den Ergebnissen von ILAN *et al.* (1996), CUSTODIO *et al.* (1998), MÜLLER *et al.* (1999) und SIPKEMA *et al.* (2003b), die multizelluläre Reaggregate mehr als 6 Monate am Leben erhalten konnten erklären. Ohne die Ausbildung eines effizienten, aquiferen Systems in den MZRA, ist eine Aufnahme von Nahrung aus dem umgebenden Wasser in gelöster oder partikulärer Form nur sehr eingeschränkt möglich. NICKEL & BRÜMMER (2003) beschreiben, dass es bei der Hälterung von MZRA zu einer Reduktion der Zellaktivität und -teilungsrate sowie der Gewebedichte kommt, die scheinbar direkt mit einer zu geringen Nahrungsaufnahme zusammenhängt, wodurch die kultivierten MZRA absterben. Zudem ist es vorstellbar, dass den MZRA, ähnlich wie den kultivierten Schwammfragmenten in Versuch 3.2.1.11, ein oder mehrere Bestandteile im Kultivierungsmedium für ein nachhaltiges Wachstum gefehlt haben.

4.3 Gemmulae

4.3.1 Auskeimversuche mit *S. domuncula*-Gemmulae

In den ersten Versuchen, ob Gemmulae von *S. domuncula* unter *ex-situ* Bedingungen auskeimen und sich zu Jungschwämmen entwickeln können, zeigten sich die ersten Anzeichen einer Auskeimung schon nach einer Woche. In diesem Zeitraum erreichten die auskeimenden Gemmulae Entwicklungsstadium 2 (3.2.3.1). Der beginnende Auskeimungsprozess war dadurch gekennzeichnet, dass die Gemmulaehülle an einer oder mehreren Stellen aufbrach und undifferenzierte Zellen (Archaeocyten, sphärolöse Zellen und weitere Zellformen, Abb. G 7) austraten, woraus eine Abnahme der optischen Dichte der Gemmulae resultierte. Begleitet wurde diese Erscheinung von einer Art „Saumbildung“ um die auskeimenden Gemmulae, so dass zwischen Gemmulae und umgebendem Milieu ein dünner Zwischenraum (ca. 5 - 10 µm breit) gebildet wurde, in dem sich weder Gemmulaezellmaterial, noch andere Partikel befanden. Die keimenden Gemmulae waren dabei meistens von vielen leeren Gemmulae, deren Zellmaterial ausgetreten war, wobei sich aber kein Gewebe gebildet hatte und von nicht gekeimten Gemmulae umgeben. Die Auskeimung trat hauptsächlich am Rand der Gemmulaeagglomerate (peripheres Auskeimen), in unmittelbarer Nähe zu durch Beschädigung ausgelaufenen Gemmulae auf. Dieses Auskeimmuster impliziert die Möglichkeit, dass durch die physische Beschädigung einiger Gemmulae, die Auskeimung weiterer Gemmulae beeinflusst werden könnte. Das beobachtete planare Ausfließen von Zellen aus auskeimenden Gemmulae (Abb. E 16) diente zum Festheften des sich formierenden Schwammgewebes an der Substratoberfläche. Von den eingesetzten und auskeimenden Gemmulae erreichten ca. 5 -10 % nach 2 - 3 Wochen Entwicklungsstadium 4 (3.2.3.1). Deutlich zu erkennen war die Organisation eines primären aquiferen Systems im Gewebe der auskeimenden Gemmulae bzw. des sich entwickelnden Jungschwamms und die Ausbildung eines Osculums (Abb. E 16). Die Jungschwämme erreichten Entwicklungsstadium 5 nach ca. 7 - 10 Wochen und konnten insgesamt ca. 3½ - 4 Monate am Leben erhalten werden. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der eingesetzten Gemmulae je Objektglaträger und der Auskeimrate war nicht feststellbar. Stellenweise verblieben noch nicht ausgekeimte Gemmulae im Träger, die auch nach weiteren sechs Monaten in Kultivierung nicht auskeimten. Bei mehreren sich formierenden Jungschwämmen zeigten sich schon nach 4 - 6 Wochen Anzeichen einer beginnenden Degeneration des Gewebes.

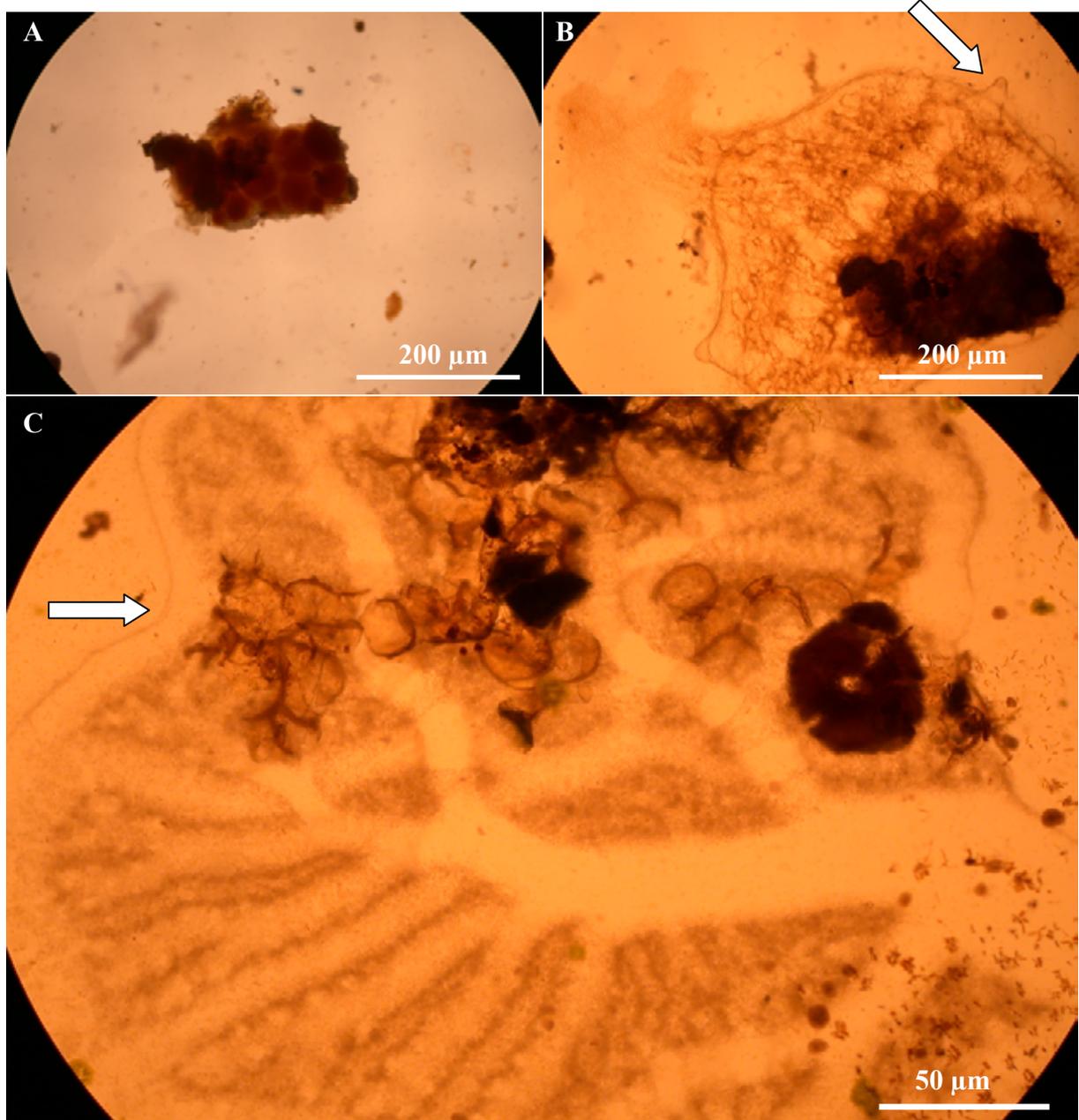


Abb. E 16: (A) Agglomeration von ca. 12 *S. domuncula*-Gemmulae nach dem Einsetzen in einen Objektglasträger, Entwicklungsstadium 1. (B) Auskeimende Gemmulae und Bildung eines Jungschwammes nach 3 Wochen in Kultivierung. Zu erkennen ist ein planares Ausbreiten von Zellen, das zum Festheften am Substrat dient (links im Bild), die beginnende Ausbildung des aquiferen Systems im Gewebe und die Bildung eines Osculums (Pfeil). Die auskeimenden Gemmulae erreichten damit Entwicklungsstadium 4. (C) Aus Gemmulae gekeimtes Jungschwammgewebe, nach 10 Wochen in Kultivierung, entspricht Entwicklungsstadium 5. Gut zu erkennen ist die fortgeschrittene Organisation des aquiferen Systems im Schwammgewebe und die Abgrenzung des Jungschwammes nach außen, durch die Bildung eines Pinacoderms (Pfeil). Vergrößerung für Bild A und B: 40x, für Bild C: 100x.

Das Osculum der Jungschwämme wurde dabei vollständig zurückgebildet, zeitgleich begann das Schwammgewebe abzusterben, so dass nach weiteren 1 - 3 Wochen nur noch geringe Mengen Spicula und leere Gemmulaehüllen in den Objektglasträgern verblieben.

Ein Umstand, der die Bildung von Jungschwämmen erschwerte war, dass ruhende und keimende Gemmulae, sowie neu gebildetes Schwammgewebe, von Turbellarien, Nematoden und Copepoden, deren Eier und Larven mit den Gemmulae in die Objektglaträger eingesetzt worden waren als Nahrungsquelle genutzt wurden, wodurch die Jungschwämme sehr schnell abstarben. Der Versuch diese Kontaminanten durch eine Erhöhung des Intervalls des Kultivierungsmediumswechsels zu eliminieren, erbrachte nur eine geringe und kurzfristige Verbesserung des Problems.

Mit den Auskeimversuchen mit Gemmulae konnte gezeigt werden, dass die in Objektglaträger eingesetzten Gemmulae unter *ex-situ* Bedingungen auskeimen und sich zu Jungschwämmen entwickeln können. Daraufhin wurde gezielt versucht, durch Veränderung der Wassertemperatur (4.3.2), der Versorgung mit gelöster und partikulärer Nahrung (4.3.3) und des Lichtregimes (4.3.4), die Keimung und die Entwicklung der sich bildenden Jungschwämme zu beeinflussen.

4.3.2 Auskeimung von Gemmulae in Abhängigkeit von der Wassertemperatur

In dieser Untersuchung sollte bestimmt werden, inwieweit sich die Auskeimung von *S. domuncula*-Gemmulae durch Veränderung der Wassertemperatur beeinflussen bzw. steigern lässt und dabei gleichzeitig die Sterberate der Schwammzellen so gering wie möglich zu halten. Von den Gemmulae die bei 22 - 25 °C Wassertemperatur kultiviert wurden (3.2.3.2), waren nach 3 Wochen ca. 90 % der Gemmulae ausgekeimt und nach 8 Wochen ~ 100 % (Abb. E 17). Allerdings kam es bei der Auskeimung dieser Gemmulae nur in sehr geringem Umfang zur Bildung von neuem Schwammgewebe und weniger als 3 % der keimenden Gemmulae hatten in diesem Zeitraum Entwicklungsstadium 3 (3.2.3.1) erreicht. Schon nach 5 - 10 Tagen begann das sich ausbreitende Zellmaterial wieder abzusterben, ohne dass sich ein Jungschwamm gebildet hatte. Zudem kam es in diesem Kulturansatz zu starkem Fraß durch Copepoden und Turbellarien an den Gemmulae und am Zellmaterial der Jungschwämme. Nach 12 Wochen war das Zellmaterial vollständig abgestorben, oder gefressen worden. Die bei 15 °C bzw. 18 °C inkubierten Gemmulae, keimten deutlich langsamer aus, als die bei 22 - 25 °C inkubierten (Abb. E 17). Nach einer „Anlaufphase“ von ~ 5 Wochen, in der weniger als 10 % der eingesetzten Gemmulae ausgekeimt waren, stieg die Auskeimrate beider Kulturen sprunghaft an und erreichte nach ~ 6 Wochen einen Wert von ~ 60 - 70 %.

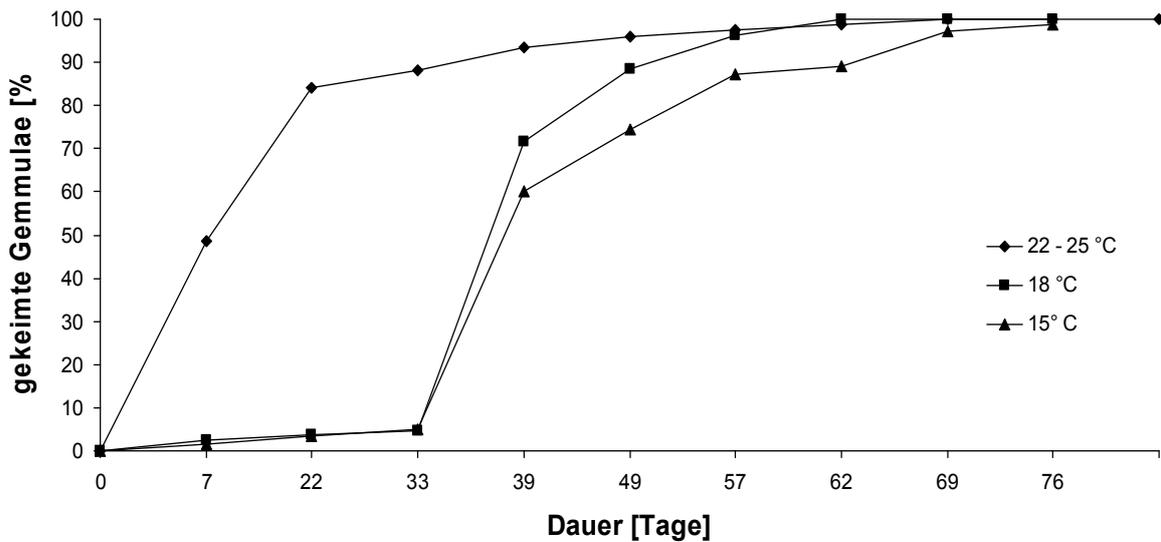


Abb. E 17: Auskeimungsrate von *S. domuncula*-Gemmulae in Abhängigkeit von der Wassertemperatur, bei der die Gemmulae inkubiert wurden.

Im weiteren zeitlichen Verlauf flachte die Steigung der Kurve der Auskeimrate wieder ab und nahm gegenüber der Auskeimrate von Gemmulae bei 22 - 25 °C einen ähnlichen Verlauf an. Nach ~ 9 Wochen waren alle bei 18 °C kultivierten Gemmulae ausgekeimt und in der 15 °C Kultur wurde eine Auskeimrate von 100 % nach ~ 11 Wochen erreicht. In beiden Kulturen hatten mehrere Gemmulae Entwicklungsstadium 5 erreicht und Jungschwämme gebildet. Diese Jungschwämme konnten über einen Zeitraum von ca. 4 - 5 Monaten am Leben erhalten werden.

In den Untersuchungen, in wie weit die Auskeimung von Gemmulae von der Wassertemperatur beeinflusst wird konnte festgestellt werden, dass mit zunehmender Temperatur die Auskeimrate der Gemmulae ansteigt. Vergleichbare Ergebnisse wurden von HARSHA *et al.* (1983) für *Ephydatia fluviatilis* und *Spongilla alba* erzielt und nachgewiesen, dass die Auskeimung der Gemmulae vieler Schwammarten direkt und sehr stark von der Wassertemperatur abhängig ist und diese auch einen nachhaltigen Einfluss auf die Saisonalität der Gemmulaebildung hat. FELL (1974) beschreibt, dass die Auskeimung der Gemmulae abhängig vom ökologischen Toleranzbereich der verwendeten Schwammart entsprechend der Wassertemperatur im natürlichen Habitat erfolgt. In der Kultivierung von Gemmulae bei einer Wassertemperatur < 15 °C erfolgte keine Auskeimung von Gemmulae. Nach mehr als 6 Monaten Inkubationsdauer waren von den eingesetzten Gemmulae nahezu alle immer noch keimfähig, sichtbar an der ausgeprägten Färbung der Gemmulae.

Bei höheren Temperaturen von 15 - 18 °C konnte eine Zunahme von auskeimenden Gemmulae festgestellt werden, aus denen sich Jungschwämme bildeten, die nach einiger Zeit deutliche Anzeichen der Bildung eines aquiferen Systems zeigten. Die Jungschwämme wirkten vital und robust und konnten insgesamt über mehrere Monate am Leben erhalten werden. Eine noch höhere Wassertemperatur von 22 - 25 °C beschleunigte das Auskeimen und die Gemmulae keimten in deutlich umfangreicherer Anzahl aus, als vergleichsweise bei 15 - 18 °C. Das sich formierende Gewebe starb aber schon nach kurzer Zeit wieder ab, wobei es nur in Ansätzen zur Bildung von Jungschwämmen kam. Empirisch konnte festgestellt werden, dass mit steigender Wassertemperatur scheinbar die Vitalität der auskeimenden Zellen abnahm und zeitgleich die Sterberate der Zellen zunahm (Abb. G 9 und G 11), vergleichbar zu den Ergebnissen von SIPKEMA *et al.* (2004). Ähnliche Beobachtungen, dass höhere Temperaturen die Auskeimrate und -geschwindigkeit sowie die Vitalität der Zellen beeinflussen, wurden auch für die Schwammarten *Haliclona loosanoffi* und *H. oculata* VON FELL (1974), für *Eunapius fragilis* (BOUTSELIS *et al.* 1990), sowie von STREKAL & MCDIFFETT (1974) für *Spongilla fragilis* gemacht. Die Verringerung der Vitalität der Zellen ist dabei vermutlich auf eine Erhöhung des Zellstoffwechsels durch die steigenden Temperaturen zurückzuführen, der eine beschleunigte Abnahme der gespeicherten Reservestoffe, die in Form von „yolkplatelets“ (Abb. G 7) vorliegen (SIMPSON 1984, LOOMIS *et al.* 1996) verursacht. Dadurch könnten die auskeimenden Gemmulae unter Nahrungsmangel und Hungerbedingungen gelitten haben, weshalb es bei 22 - 25 °C nicht zur Bildung von Jungschwämmen gekommen ist.

4.3.3 Ernährung von Gemmulae und Jungschwämmen mit partikulärer Nahrung und gelösten Substanzen

Die Untersuchung, auskeimende Gemmulae und Jungschwämme durch eine Zudosierung von Ethanol, Eisencitrat, Natronwasserglas, Pepton, Hefeextrakt und partikulären Futterorganismen (Tab. M 2) zu ernähren, erbrachten keinen Erfolg. Bei fast allen eingesetzten Gemmulae konnten über einen Zeitraum von mehr als 10 Wochen keine Anzeichen einer beginnenden Auskeimung festgestellt werden. Das Gewebe bzw. Zellmaterial der wenigen auskeimenden und vieler nicht ausgekeimter Gemmulae, wurde von Kontaminanten gefressen. Von den verbleibenden Gemmulae verpilzte ein großer Teil, sichtbar an einem weißlichen Überzug. Diese Gemmulae starben ohne die Freisetzung von Zellmaterial ab, so dass nur leere Hüllen und Spicula in den Objektglaträgern verblieben.

Die verbliebenen Gemmulae keimten auch nach weiteren 4 - 6 Monaten nicht aus, so dass der Versuch abgebrochen wurde. Aufgrund dieses Umstandes wäre es denkbar, dass sich die verwendeten Gemmulae im Zustand prospektiver Dormanz befanden und bspw. die Einwirkung eines Tieftemperaturimpulses zum Brechen der Dormanz und für die Initialisierung der Auskeimung erforderlich gewesen wäre.

4.3.4 Einfluss von Licht auf die Auskeimung von Gemmulae

Die Untersuchung, ob sich die Auskeimung von Gemmulae durch Licht, d.h. eine Beleuchtung mit Tageslichtstrahlern beeinflussen lässt, konnte nicht im geplanten Rahmen durchgeführt werden. Auf den Objektglaträgern, mit den eingesetzten Gemmulae (Abb. M 10), hatte sich schon nach wenigen Tagen ein zunehmend dichter werdender Aufwuchs von Kalkrotalgen gebildet, der die Gemmulae vollständig vom Lichteinfall abschirmte. Ein wiederholtes mechanisches Entfernen des Aufwuchses mit einem Skalpell brachte keine nennenswerte und dauerhafte Veränderung. Zusätzlich kam es im Kultivierungsbecken E (3.1.2), in dem das Kultivierungsmodul platziert worden war, zu einem starken Wuchs von Grün- und Braunalgen. Durch das Ansaugen von Algenteilen kam es zum Verstopfen der Förderpumpe des Kultivierungsmoduls (3.2.1.2), woraus vermutlich eine Unterversorgung der Gemmulae mit Frischwasser, Sauerstoff und Nahrung resultierte, so dass ein großer Teil der Gemmulae abstarb. Außerdem kam es zu massiven Fraß am Gemmulaezellmaterial bzw. am Schwammgewebe durch Copepoden, Turbellarien und Nematoden, wodurch die Anzahl der Gemmulae verringert und nach < 6 Wochen vollständig dezimiert wurde. Die Untersuchung, wurde daraufhin ergebnislos abgebrochen. Die Frage, ob das Auskeimen von Gemmulae von Licht beeinflusst wird, kann daher nicht beantwortet werden. Ausgehend davon, dass durch Brechung in 30 - 35 m Tiefe nur noch langwelliges, blaues Licht mit einer Intensität von deutlich unter $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ gelangt (SOMMER 1998), hat dieser Faktor vermutlich keinen, oder nur einen geringen Effekt auf die Auskeimung von Gemmulae von *S. domuncula*.

4.3.5 Auskeimversuche mit Gemmulae in 24-Loch-Platten

Versuch 1

In der Untersuchung, Gemmulae in 24-Loch-Platten auskeimen zu lassen und in verschiedenen Medien zu kultivieren (3.2.3.5) kam es nur bei Gemmulae in RMW, gefüttert mit *Synechococcus* sp., 10^5 Zellen ml^{-1} , zur Bildung von Jungschwämmen. Die Auskeimrate der eingesetzten Gemmulae betrug nach 6 Wochen weniger als 5 %, nach 10 Wochen ~ 15 % und nach 14 Wochen < 20 %. Bei den auskeimenden Gemmulae, kam es zu einer flächig sehr begrenzten, planaren Ausdehnung des freigesetzten Zellmaterials. Lediglich 1 % der keimenden Gemmulae erreichte Entwicklungsstadium 4 bzw. 5 (3.2.3.1). Über der kreisrunden Anheftungsfläche der freigesetzten Schwammzellen am Substrat, begann sich der Jungschwammkörper kegelförmig zu formieren. Auf der Spitze des Kegels entstand ein winziges Osculum, das in seiner axialen Ausrichtung etwa senkrecht zum Substrat ausgebildet wurde. Diese Jungschwämme konnten ca. 2 - 3 Monate am Leben erhalten werden.

In ASW kam es dagegen nicht zur Ausbildung von Jungschwämmen. Einige keimende Gemmulae begannen zwar Zellmaterial freizusetzen und sich am Substrat festzuheften, aber eine Gewebebildung und -differenzierung blieb aus, so dass das Zellmaterial nach 3 - 5 Wochen wieder abstarb. Eine sehr ähnliche Entwicklung war in SMW zu beobachten, wobei hier ca. 3 - 5 % der keimenden Gemmulae Stadium 3 erreichten, bevor sie abstarben.

Ein Effekt der zudosierten Futterorganismen, *Synechococcus* sp. bzw. *Phaeodactylum tricorutum*, auf die Entwicklung der Gemmulae zum Jungschwamm konnte in keinem Versuchsansatz nachgewiesen werden. Augenscheinlich wurden weder *Synechococcus* sp.- noch *Phaeodactylum tricorutum*-Zellen von den Jungschwämmen als Nahrung aufgenommen. Anderenfalls hätten sich die Jungschwämme grünlich (bei Aufnahme von *Synechococcus* sp.) bzw. bräunlich (bei Aufnahme von *Phaeodactylum tricorutum*), ähnlich den Beobachtungen von OSINGA *et al.* (1997) verfärbt. Die eingesetzten Futterorganismen sedimentierten ab, verklumpten zu größeren Aggregationen auf dem Boden der einzelnen Reaktionsgefäße der 24-Loch-Platten und wurden mit dem nächsten Mediumswechsel entfernt, um Sauerstoffzehrung durch Zersetzungsprozesse der Zellen zu vermeiden.

In den Versuchen Gemmulae in 24 Loch-Platten-Kulturen auskeimen zu lassen und den Einfluss verschiedener Kulturmedien und partikulärer Nahrung zu testen, keimten nur wenige Gemmulae aus und nur in RMW kam es zur Bildung von einigen, wenigen Jungschwämmen.

Eine Erklärung für das unterschiedliche Auskeimverhalten der Gemmulae in den drei Kulturmedien, konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise befand sich der Großteil der eingesetzten Gemmulae wie in Versuch 3.2.3.3 (siehe 4.3.3) im Zustand prospektiver Dormanz, die nicht gebrochen werden konnte, so dass es nicht zur Auskeimung von Gemmulae kam.

Die zudosierte partikuläre und gelöste Nahrung war scheinbar für den Entwicklungsprozess keimender Gemmulae und Jungschwämme nicht geeignet, bzw. wurde von den Jungschwämmen nicht aufgenommen. Dies zeigte sich daran, dass die ungefütterten Gemmulae in den Kontrollansätzen eine ähnliche Entwicklung, verglichen mit den gefütterten Gemmulae aufwiesen. Daher ist davon auszugehen, dass diese Form der Nahrungsversorgung ineffektiv war, oder eine Ernährung mit partikulärer Nahrung für Gemmulae nicht angewendet werden kann. Im Gegensatz zu den Resultaten von FRANCIS *et al.* (1982) oder HARSHA *et al.* (1983) die für die Ernährung von *Spongilla alba* mit einer gepulsten Zudosierung von 10^8 *E. coli*-Zellen ml^{-1} erzielt wurden, konnten die eingesetzten Zellzahlen die Entwicklung und Überlebensdauer der keimenden *S. domuncula*-Gemmulae und Jungschwämme nicht positiv beeinflussen.

Versuch 2

Um die Dauer bis zur Auskeimung zu verkürzen, sollten Gemmulae nach dem Einsetzen in die 24-Loch-Platten bei Raumtemperatur, RT, (22 - 25 °C) inkubiert und nach erfolgter Keimung bei 18 °C kultiviert werden. Nach 6 - 8 Wochen waren in keiner der vier 24-Loch-Platten Anzeichen von Auskeimung bei den Gemmulae festzustellen. Es wurde deshalb angenommen, dass sich die eingesetzten Gemmulae im Zustand konsekutiver oder prospektiver Dormanz befinden könnten (vergleichbar zu den Ergebnissen in 4.3.3, 4.3.5). Um die Keimruhe zu brechen und die Auskeimung anzuregen wurden die Gemmulae in den 24-Loch-Platten, bei 4 °C für vier Wochen im Kühlschrank inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Platten wieder auf RT temperiert und weiter inkubiert. Trotz des Kälteimpulses kam es in keiner Kultur zur Auskeimung von Gemmulae. Zusätzlich begann die Masse der Gemmulae abzusterben, sichtbar an der abnehmenden Anzahl optisch dichter Gemmulae.

Da der Kälteimpuls möglicherweise zu kurz war um die Keimruhe zu brechen, wurden die 24-Loch-Platten mit den Gemmulae wie von FELL (1989, 1995) beschrieben erneut, für (a) eine Woche, (b) zwei Wochen, (c) vier Wochen und (d) für sechs Wochen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (die Platten werden nun als 2a-d bezeichnet). Anschließend wurden alle 24-Loch-Platten wieder bei RT bis zum Versuchsende, nach 6 Monaten inkubiert. Trotz der mehrmaligen Einwirkung von tiefen Temperaturen konnte die Keimruhe der Gemmulae nicht gebrochen werden. Nach insgesamt 23 Wochen Versuchsdauer war es bei keinem Gemmula zur Auskeimung gekommen.

Das Ausbleiben der Auskeimung der in Versuch 2 eingesetzten Gemmulae ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die verwendeten Gemmulae in einem besonders tiefen Zustand der prospektiven Dormanz befanden haben könnten, wie von FELL (1995) für *Spongilla lacustris* und *Eunapius fragilis* beschrieben wurde. Eine kurzzeitige Inkubation bei niedrigen Temperaturen zeigte daher kaum einen Effekt auf die Auskeimrate (FELL 1987, BOUTSELIS *et al.* 1990). Auch durch ein erneutes Inkubieren der Gemmulae bei niedrigen Temperaturen, konnte entgegen der von FELL (1995) gewonnenen Resultate, dass die Auskeimrate nach einer längeren Kälteperiode proportional zur Dauer des Tieftemperaturimpulses ansteigt, bei Gemmulae von *S. domuncula* nicht gemacht werden (Abb. G 10). Das Ausbleiben der Keimung könnte dahingehend interpretiert werden, dass die Dauer des Kälteimpulses insgesamt zu kurz war, um die Dormanz der Gemmulae zu brechen. RASMONT (1954) und LOOMIS *et al.* (1996) beschreiben die Möglichkeit, dass es auch nach einer ausreichend langen Einwirkung eines Tieftemperaturimpulses vorkommen kann, dass Gemmulae nicht auskeimen. Es wäre daher möglich, dass ein weiterer Faktor für eine ausbleibende Auskeimung (mit-)verantwortlich ist, so dass die Gemmulae trotz Tieftemperatureinwirkung dauerhaft in Dormanz verbleiben.

4.4 Immobilisierung von Schwammzellen

4.4.1 Screening nach geeigneten Schwammarten zur Immobilisierung

Aufgrund der Ergebnisse zur mechanischen Dissoziierbarkeit von Schwammgewebe für die Erzeugung von MZRA (4.2.1), wurden nur wenige Schwammarten auf ihre Eignung zur Immobilisierung von Zellen in Kalzium-Alginat (KA), bzw. Cellulosesulfat (CS) getestet (Tab. E 4). Mikroskopische Untersuchungen der dissoziierten Zellen in Suspension zeigten, dass die meisten Zellen in der Kombination aus mechanischer und chemischer Dissoziation vereinzelt wurden waren und nur ein geringer Teil des Zellmaterials in Form von kleineren Aggregation $\leq 50 \mu\text{m}$ verblieb. Diese Zellsuspension ließ sich sehr gut mit den beiden Matrixsubstanzen zur Immobilisierung mischen und vertropfen.

Tab. E 4: Überblick über die getesteten Schwammarten auf ihre Eignung für die Herstellung von Immobilisaten. ++ = sehr gut geeignet, - = nicht geeignet, n. det. = nicht untersucht.

Schwammart	Eignung für die Herstellung von MZRA
<i>A. aerophoba</i>	-
<i>A. polypoides</i>	++
<i>C. nucula</i>	-
<i>C. reniformes</i>	-
<i>P. ficiformis</i>	n. det
<i>S. domuncula</i>	++
<i>S. massa</i>	n. det

Beim Vertropfen der Zell-Matrixsuspension ergaben sich für KA stabile Kapseln mit einem Durchmesser von 2 - 3 mm Durchmesser. Bei CS-Immobilisaten war der Durchmesser etwas geringer, 1 - 2 mm, und die Stabilität deutlich niedriger war, als bei KA-Immobilisaten. Die CS-Immobilisaten ließen sich sehr leicht zwischen zwei Fingern zerreiben, wohingegen die KA-Immobilisate nur unter Aufwendung von größerem Druck zerquetscht werden konnten. Das die Zellen die Immobilisierung überlebt hatten (2.3.5.3a), wurde augenscheinlich schon durch die Färbung der Immobilisate nach erfolgter Immobilisierung angezeigt. Immobilisate von *A. polypoides* waren leuchtend orange, bei *S. domuncula* etwas weniger intensiv orange gefärbt (Abb. E 18). Bei Beschädigung der Zellen wäre das Zellplasma ausgelaufen und die Färbung wäre vermutlich viel schwächer ausgefallen oder gänzlich ausgeblieben.

Trotz des Verzichts von Antibiotika und Antifungiziden während der Immobilisierung und der Kultivierung der Immobilisat-Kugeln, kam es zu keiner Infektion mit Mikroorganismen. Ein Problem das beobachtet werden konnte, war die Selbstaflösung der KA- Immobilisate nach ~ 10 Tagen. Möglicherweise starben die immobilisierten Zellen in KA ab und verursachten so die Auflockerung, Größenreduktion und Auflösung der Immobilisat-Kugeln. Die Größe der CS-Immobilisate änderte sich dagegen nicht und die Kugeln blieben über die gesamte Versuchsdauer in ihrer Konsistenz stabil.

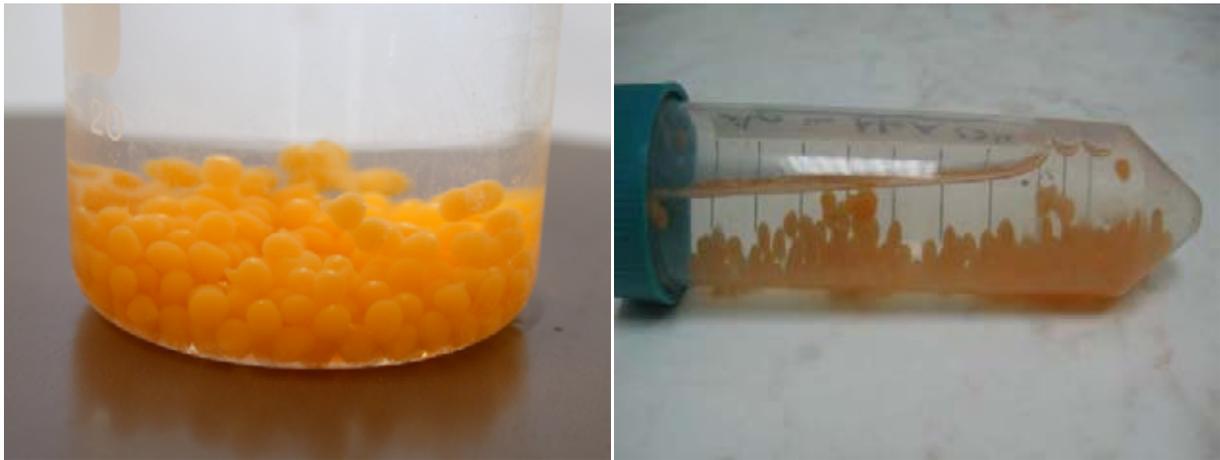


Abb. E 18: *A. polyoides*-Immobilisate (links) und von *S. domuncula* (rechts), jeweils in Kalzium-Alginat, in ASW.

4.4.2 Proliferationsnachweis (BrdU-Assay) - Detektion der mit BrdU markierten DNA

Mit dem Einsatz des BrdU-Assays sollte die Frage (2.3.5.3b), wie lange die immobilisierten Zellen in der Kultivierung am Leben bleiben beantwortet werden. Dieser Nachweis gelang in KA-Immobilisaten nur wenige Mal, in CS-Immobilisaten hingegen nicht (Abb. E 19). Die ideale Anregungsdauer für eine Aufnahme der Immobilisate lag bei < 1 sec. Bei längerer Anregungsdauer mit hochenergetischem Licht wäre der Fluoreszenzfarbstoff zerstört worden und die Präparate wären ausgebleicht („Photo-bleaching“). Zudem detektiert das Bildbearbeitungsprogramm des Mikroskops dann mehr Artefakte im Präparat, die fälschlicherweise als BrdU-Signale interpretiert werden (TER HASEBORG, persönl. Mitteilg.).

In den Bemühungen die Integration von BrdU in neusynthetisierte DNA nachzuweisen, konnte durch den Einsatz von höheren BrdU-Konzentrationen (20 - 50 μ M) keine erhöhte Anzahl an BrdU-positiven Zellkernen im Präparat nachgewiesen werden.

Ähnlich den Ergebnissen von GRATZNER (1982) und MIZOGUCHI & WATANABE (1994) wurde zudem festgestellt, dass höhere BrdU-Konzentration letale Auswirkungen auf die Zellen hatten, weshalb auf deren Einsatz verzichtet wurde. Auch durch eine Erhöhung der Konzentration des primären oder sekundären Antikörpers (3.2.4.2), konnte kein (stärkeres) BrdU-Signal detektiert werden. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellkerne war nach 24 h Inkubationszeit sehr gering, bzw. konnten nach dieser Zeitspanne keine aufleuchtenden Zellkerne, als Zeichen der erfolgreichen BrdU-Inkorporation in neusynthetisierte DNA detektiert werden.

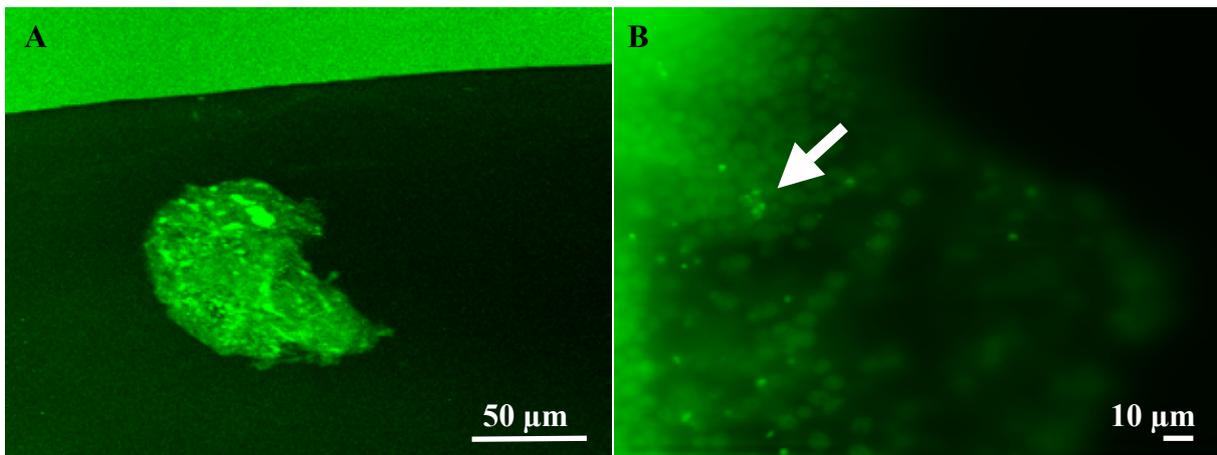


Abb. E 19: (A) *S. domuncula*-Gewebebefragung in der Randzone einer Immobilisat-Kugel (in schwarz), nach 24 h Inkubation in 10 µM BrdU-Lösung, (B) immobilisierte *S. domuncula*-Zellen in der Randzone einer KA-Immobilisat-Kugel (400x vergrößert), BrdU-positive Zellkerne leuchten deutlich heller gegenüber dem Gewebe auf (Pfeil).

CUSTODIO *et al.* (1998) beschreiben, dass in MZRA nach 24 h Inkubation in BrdU die Anzahl an BrdU-positiven Zellkernen bei nur 6,5 % lag. Von daher muss angenommen werden, dass die Inkubationszeit von KA- und CS-Immobilisat-Kugeln für 24 h in 10 µmol BrdU zu kurz war um eine Integration von BrdU in neusynthetisierte DNA zu ermöglichen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 24 auf 72 bis 144 h erbrachte jedoch keine Verbesserung der Resultate. Aufgrund dessen, dass die Teilungsrate der Schwammzellen sehr gering ist wäre es möglich, dass es nur in sehr seltenen Fällen zur erfolgreichen Inkorporation von BrdU in neusynthetisierte DNA kam.

4.4.3 Identitätsnachweis

Für die Beantwortung der Frage 2.3.5.3c, ob die immobilisierten Zellen tatsächlich Schwammzellen sind, wurde ein Identitätsnachweis durchgeführt. Die in den Immobilisaten enthaltene DNA wurde extrahiert, amplifiziert, in ein Agarose-Gel aufgetragen und in einer Gel-Elektrophorese getrennt. Nachdem die Agarose-Gele mit EtBr angefärbt worden waren, ergab sich für *S. domuncula* das in Abb. E 20 und für *A. polypoides* das in Abb. E 21 gezeigte Bandenmuster. Die besten Ergebnisse erbrachte für *S. domuncula* die Amplifikation der extrahierten DNA-Fragmente mit der Primerkombination Sub 2F - SPO_SO1R (3.2.4.4). Durch den DNA-Größenmarker wurde eine Länge der DNA-Fragmente von ~ 770 Bp Länge bestimmt, die mit der erwarteten Fragmentlänge übereinstimmt.

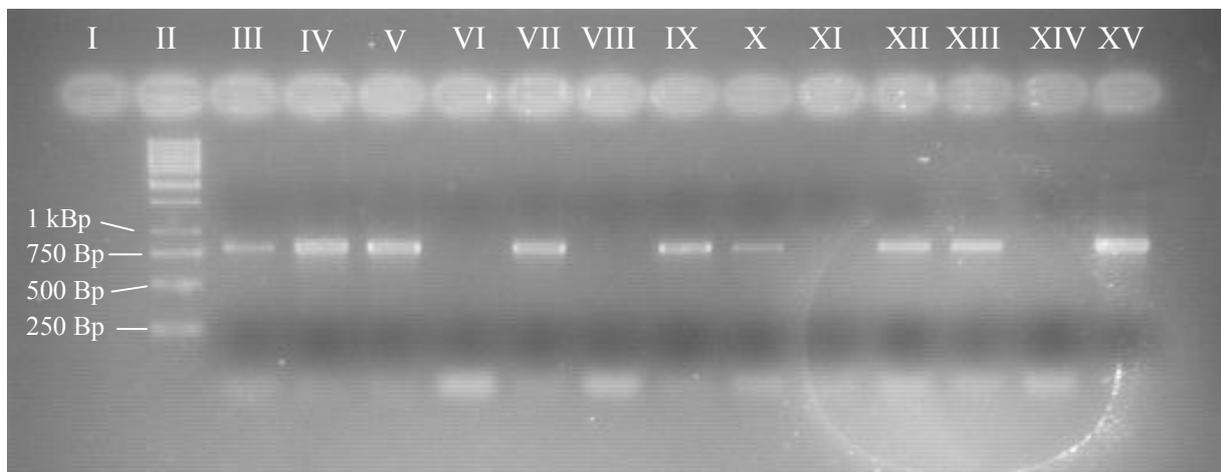


Abb. E 20: Agarose-Gel der aufgetragenen PCR-Produkte, extrahiert aus *S. domuncula*-Immobilisaten, die mit Primersystem Sub 2F - SPO_SO1R amplifiziert wurden. I. Spur: leer, II. Spur: 1 kBp DNA-Größenmarkierungs-Leiter, III. Spur: DNA aus frischem, immobilisiertem Schwammgewebe, IV. Spur: in KA, lebendig, V. Spur: in KA, tot (durch 10 minütige Hitzeeinwirkung bei ~ 80 °C abgetötet), VI. Spur: in CS, lebendig (die DNA der Proben in der IV. - VI. Spur wurde direkt nach der Immobilisierung extrahiert), VII. Spur: in KA, lebendig, VIII. Spur: in CS, lebendig, IX. Spur: in KA, tot (die DNA der Proben in der VII. - IX. Spur wurde eine Woche nach der Immobilisierung extrahiert), X. Spur: in KA, lebendig, XI. Spur: in CS, lebendig, XII. Spur: in KA, tot (die DNA der Proben in der X. - XII. Spur wurde zwei Wochen nach Immobilisierung extrahiert), XIII. Spur: in KA, tot (die DNA wurde drei Wochen nach der Immobilisierung extrahiert), XIV. Spur: Kontrolle (gleicher PCR-Ansatz wie für Spur III-XIII, aber mit PCR-Wasser statt DNA-Probe), XV. Spur: Positivprobe.

Die Kontrolle (Spur XIV) in Abb. E 20 zeigt durch das Ausbleiben einer sichtbaren Bande an, dass keine Kontamination des PCR-Wassers bzw. der Testansätze mit amplifizierbarer DNA vorgelegen hat.

Die Positivprobe (Spur XV) stammt von einer DNA-Probe, die aus frischem Gewebe von *S. domuncula* extrahiert wurde und die in einer früheren PCR vervielfältigt worden war. Sie zeigt an, dass eine erfolgreiche Amplifikation der DNA mit dem getesteten Primersystem stattgefunden hat. Die Banden der DNA-Fragmente, die aus KA-Immobilisat-Kugeln extrahiert wurden, sind im Agarose-Gel deutlich ausgeprägt. Zwischen der Bandenstärke von Spur IV bis XIII konnte nur eine leichte Veränderung mit fortschreitender Kultivierungsdauer festgestellt werden. Wodurch diese Abnahme verursacht wurde konnte nicht geklärt werden. Ein Unterschied in der Stärke der Banden von lebenden und der durch Hitze einwirkung abgetötete Zellen, um zu untersuchen ob sich eine Abnahme des DNA-Gehalts nach längerer Inkubation ergibt, konnte nicht festgestellt werden. Ein Nachweis von DNA-Fragmenten, extrahiert aus Immobilisat-Kugeln, stellt daher kein geeignetes Mittel dar, um eine Aussage über die Vitalität der Zellen über die Kultivierungsdauer treffen zu können.

Das Ausbleiben von Banden in den Agarose-Gelen in Spur VI, VIII und XI (Abb. E 20) und in Spur 5 und 9 (Abb. E 21) zeigt an, dass CS möglicherweise die DNA-Extraktion oder die PCR-Reaktion inhibiert, denn in keiner PCR mit DNA-Fragmenten aus CS-Immobilisaten konnte jemals eine Bande detektiert werden. Diese Vermutung basiert auf der Tatsache, dass die parallel erfolgte DNA-Extraktion aus Immobilisaten bei denen KA als Matrix und die gleiche Zellsuspension wie jene, die bei Immobilisierung in CS zum Einsatz kam, erfolgreich verlief.

Für *A. polypoides* waren die Ergebnisse, welche Primerkombination die besten Ergebnisse liefert, nicht eindeutig. Die Amplifikation der extrahierten DNA-Fragmente mit den Primern AXN PO3F - SPO_SO1R bzw. AXN PO4F - SPO_SO1R erbrachte sehr ähnliche Ergebnisse. Die Länge der Fragmente wurde mit ~ 740 bzw. ~ 750 Bp bestimmt und stimmt mit der erwarteten Fragmentlänge überein. Die Kontrolle, Spur 6 und 10, (Abb. E 21) zeigt durch das Ausbleiben einer sichtbaren Bande an, dass keine Kontamination der Reagenzien und der DNA-Probe mit Fremd-DNA vorgelegen hat. Das Ausbleiben einer sichtbaren Bande in Spur 3 und 7 wurde vermutlich dadurch verursacht, dass während der DNA-Extraktion ein Fehler auftrat, so dass keine DNA extrahiert wurde. Diese Vermutung wurde durch die nachträgliche optische Messung des DNA-Gehalts (bei 260 und 280 nm, Gene Quant) bestätigt. In einer später durchgeführten PCR mit einem DNA-Extrakt aus frischem, nicht immobilisiertem Gewebe von *A. polypoides*, konnte eine deutliche Bande detektiert werden.

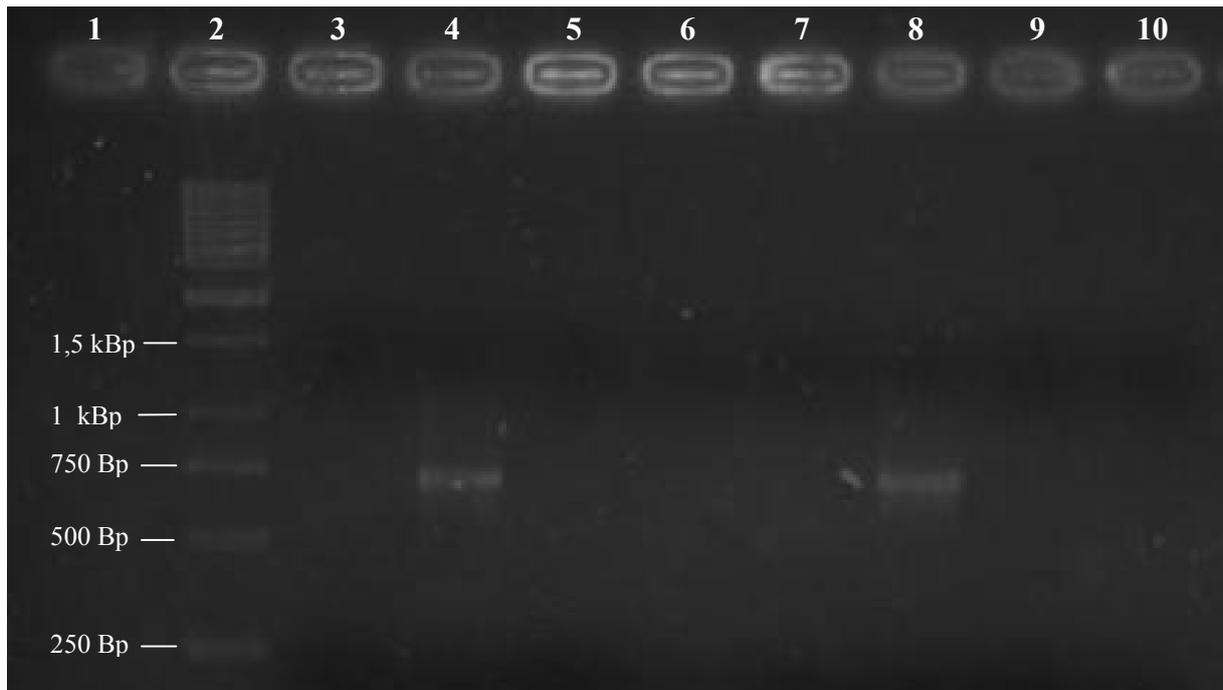


Abb. E 21: Agarose-Gel der aufgetragenen PCR-Produkte, extrahiert aus *A. polypoides*-Immobilisaten, die mit Primersystemen AXN PO3F - SPO_SO1R (Spur 3 - 6) bzw. AXN PO4F - SPO_SO1R (Spur 7 - 10) amplifiziert wurden. 1. Spur: leer, 2. Spur: 1 kBp DNA-Größenmarkierungs-Leiter, 3. Spur: DNA aus frischem, nicht immobilisiertem Schwammgewebe, 4. Spur: in KA, 5. Spur: in CS, 6. Spur: Kontrolle (gleicher PCR-Ansatz wie für Spur 3-9, aber mit PCR-Wasser statt DNA-Probe), 7. Spur: frisches, nicht immobilisiertes Schwammgewebe, 8. Spur: in KA, 9. Spur: in CS, 10. Spur: Kontrolle. Die DNA-Proben in Spur 4, 5, 8 und 9 wurden direkt nach der Immobilisierung extrahiert.

Als begrenzter Nachweis der Spezifität der beiden Primersysteme, wurden DNA-Proben von *Saccharomyces cerevisiae*, *Synechococcus* sp. und *Phaeodactylum tricorutum* amplifiziert und in einem Agarose-Gel aufgetragen, es konnten aber keine sichtbaren Banden detektiert werden. Es war ebenfalls nicht möglich mit dem Primersystem für *S. domuncula* die DNA-Sequenz von *A. polypoides* nachzuweisen und umgekehrt. Die gewonnenen Ergebnisse sind als grundlegende Untersuchungen für einen Identitätsnachweis von immobilisierten Schwammzellen zu sehen und benötigen weitere Verifizierung der Daten, besonders um die artspezifische Wirkungsweise der Primersysteme zu bestätigen.

5. Schlussfolgerungen

5.1 Faktoren, welche die *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen beeinflussen

Die Entnahme von Schwämmen aus ihrem natürlichen Habitat, der Transport und die Adaptation an die Bedingungen in den Kultivierungsbecken (3.1.2) stellten in der vorliegenden Arbeit scheinbar die kritischsten Abschnitte in den Bemühungen dar, Schwämmen unter *ex-situ* Bedingungen zu kultivieren, vergleichbar den Ergebnissen von NICKEL & BRÜMMER (2003). Bei der Entnahme, der in den verschiedenen Untersuchungen verwendeten Schwämme war es essentiell wichtig, eine geringe Menge unterstützendes Substrat an den sessilen Individuen (3.1.3) zu belassen. Ohne Substrat entnommene Schwammindividuen, speziell von *A. aerophoba*, starben innerhalb kürzester Zeit, möglicherweise verursacht durch eine Infektion der Schnittwunde(n) ab. Ebenso wichtig für ein Überleben der Schwämme war der Zeitpunkt, bzw. die Jahreszeit, zu der die Schwämme aus ihrem natürlichen Habitat extrahiert wurden, wie auch von VAN TREECK *et al.* (2003) und DUCKWORTH & BATTERSHILL (2003a, b) oder DE CARALT *et al.* (2003) vermutet wurde. Gleich lautend zu den Ergebnissen DE CARALT *et al.* (2003) hatten Schwämme, die in heißen Sommermonaten extrahiert wurden, eine verringerte Überlebensrate gegenüber den Schwämmen, die im Frühjahr extrahiert wurden. Durch Kühlung während des Transports, besonders in den heißen Sommermonaten sollte garantiert werden, dass keine allzu großen Temperaturschwankungen auftraten. Kam es dennoch zu starken Temperaturschwankungen, verendeten die Schwämme meistens innerhalb weniger Tage. Dabei wurden Temperatursenkungen besser toleriert, als Temperaturerhöhungen. Des Weiteren war es immens wichtig, die Sauerstoffversorgung der Schwämme während des Transports sicherzustellen. Die Menge der eingeschlossenen Luft in den Verpackungsgefäßen musste so gewählt werden, dass ausreichend O₂ für die Atmung jedes einzeln verpackten Schwammindividuums zur Verfügung stand. Andererseits musste die Menge klein genug sein, so dass durch Erschütterungen keine Gasbläschen entstehen konnten, die ins aquifere System der Schwämme gelangen und diese schädigen konnten. Durch diese Form des Transports konnte es zudem nicht zur Vergiftung anderer Individuen durch ins Wasser abgegebene Substanzen kommen. Verletzte Individuen setzen häufig Substanzen frei, z.B. C₂H₂, die bei anderen Individuen und Arten, Stress durch Vergiftung oder Nekrose hervorrufen (STEFFENS 2003, NICKEL 2001). Solche Individuen degenerierten und starben in den meisten Fällen schon binnen weniger Tage ab.

Nach dem Transport der Schwämme nach Karlsruhe, stellte die langsame Adaptation an die in den Kultivierungsbecken (3.1.2) herrschenden Bedingungen, einen weiteren kritischen Schritt für das Überleben dar. Das die Schwämme für mindestens 24 h an die Beckentemperatur adaptiert wurden, erhöhte die Überlebensrate der Schwämme nachhaltig gegenüber den Schwämmen, die direkt nach dem Transport in die Becken eingesetzt wurden. Das Einsetzen der Schwämme in Kultivierungsbecken (3.1.2) mit Bodengrund führte außerdem zu einer erhöhten Überlebensrate und gesteigerter Vitalität der Schwämme, gegenüber jenen Schwämmen, die in Becken ohne Sedimentgrund (z.B. Modulbecken H, 3.1.2) eingesetzt wurden. Diese Steigerung ergab sich vermutlich daraus, dass sich im Sediment eine endobenthische Gemeinschaft ausbilden konnte, die bspw. für die Stickstofffixierung und den Auf- und Abbau von organischen und anorganischen Verbindungen im Beckenwasser sorgte, von der die eingesetzten Schwämme profitierten.

Das Überleben der Schwämme nach dem Einsetzen in die Kultivierungsbecken (3.1.2) hing weiterhin von einer permanenten Durchströmung des Beckens ab, deren Wichtigkeit von WILKINSON & VACELET (1979) beschrieben wurde. Sofern die Strömung bspw. durch starkes Algenwachstum oder den Ausfall der Turbelle (3.1.2) eingeschränkt war, kam es vermutlich durch Sauerstoffzehrung in den Becken zu O₂-Mangelserscheinungen, die sich negativ auf die Vitalität der Schwämme auswirkte. Außerdem ist es denkbar, dass sich verschiedene Substanzen im Wasserkörper anreicherten, z.B. NO₂⁻, NH₄⁺ oder Huminstoffe, die eine Abnahme der Vitalität der Schwämme verursacht haben könnten, wie von BAYER *et al.* (2007, 2008) beschrieben wurde.

Eine erhöhte Überlebensrate in den Versuchen konnte auch dadurch erzielt werden, dass die Herstellung von Schwammfragmenten (3.2.1.5) und multizellulären Reaggregaten, MZRA (3.2.2.1), die Immobilisierung von Schwammzellen (3.2.4), sowie Versuche mit Gemmulae (3.2.3.1) erst mehrere Wochen nachdem die Schwämme in die Kultivierungsbecken eingesetzt worden waren erfolgte, wie von NICKEL *et al.* (2001) bzw. von NICKEL & BRÜMMER (2003) empfohlen wurde.

5. 2 Schwammfragmente

Mit dem Kultivieren von Schwammfragmenten, eingesetzt in Fragmentträger als „Sandwich-Kultur“, konnte eine einfache und kostengünstige Methode genutzt, bzw. für eine dauerhafte *ex-situ* Kultivierung optimiert werden. Für diese Kultivierungsmethode wurde der Einfluss verschiedener Faktoren untersucht, inwiefern sie das Wachstum und die Überlebensrate von Schwammfragmenten beeinflussen. In den durchgeführten Versuchen zur *ex-situ* Kultivierung von Schwammfragmenten (3.2.1.4 - 3.2.1.11) zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen, verwendeten Arten (3.1.3) in Bezug auf ihre Eignung für Fragmentierungsversuche, sowie für Wachstum und Überlebensraten. Von den untersuchten Faktoren hatte die Wassertemperatur den stärksten Einfluss auf die Vitalität der Schwammfragmente (4.1.2). Die meisten Fragmente überlebten und wuchsen am besten in kühleren Temperaturen von < 20 °C. Dabei konnte festgestellt werden, dass je näher die Wassertemperatur an den Bedingungen im natürlichen Habitat lag, desto größer war die Wahrscheinlichkeit, dass die Fragmente überlebten. In Wassertemperaturen von > 20 °C kam es bei den Fragmenten mehrerer Schwammarten zu einer deutlichen Zunahme der Sterberate. Damit scheint belegt, dass offensichtlich jede Schwammart einen eng begrenzten, physiologischen Toleranzbereich gegenüber der Wassertemperatur hat, so dass die Ergebnisse für den optimalen Temperaturbereich zur *ex-situ* Kultivierung, nicht universell von einer Art auf weitere Schwammarten übertragen werden können.

Die Untersuchungen, inwieweit Licht einen Einfluss auf das Wachstum und das Überleben von Schwammfragmenten hat, konnte nicht wie im geplanten Umfang durchgeführt werden, denn durch starkes Algenwachstum wurden die kultivierten Schwammfragmente (3.2.1.6, 3.2.1.7) fast vollständig vom Licht abgeschirmt. Von WILKINSON & FAY (1979), WILKINSON & VACELET 1979, BELARBI *et al.* (2003) und HOOPER & VAN SOEST (2002) wurde beschrieben, dass eine Beleuchtung nur auf Schwammarten mit einem hohen Anteil photosynthetischer Symbionten einen Einfluss hätte. Schwammarten mit einer hohen Abundanz assoziierter, photosynthetisch aktiver Mikroorganismen müssen weniger partikuläre Nahrung aus dem umgebenden Wasser aufnehmen, denn sie können die Mikroorganismen als Nahrungsquelle nutzen (WILKINSON & VACELET 1979, BELARBI *et al.* 2003). Bei der visuellen Kontrolle der beiden Durchflussbecken im April 2007 (3.2.1.7) lag die Vermutung nahe, dass durch die aufgetretene Einschränkung der Lichteinstrahlung die Anzahl der Symbionten im Schwammgewebe abgenommen und die Schwammfragmente einen großen Teil ihrer Nahrungsgrundlage verloren haben müssten.

Entgegen dieser Annahme konnte jedoch festgestellt werden, dass die Fragmente der photophilen Schwammart *A. aerophoba* (3.1.3.1), trotz starker Einschränkung der Lichteinstrahlung und der dadurch vermutlich abnehmenden Anzahl assoziierter Mikroorganismen nicht abstarben, sondern sich sogar in funktionelle Schwämme reorganisierten, dabei aber ihre Fläche verringerten. Möglicherweise waren die Fragmente in der Lage, durch Mobilisierung von gespeicherten Reservestoffen zu überleben, denn eine Aufnahme von DOC aus dem Wasser konnte nicht festgestellt werden. Bei der (semi)-kryptischen Schwammart *S. domuncula* (3.1.3.3) konnte dagegen festgestellt werden, dass die Fragmente im abgedunkelten Becken nahezu vollständig abgestorben waren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Anzahl der Symbionten im Schwammgewebe dieser Art durch die Beschattung abnahm und nicht mehr ausreichte, um als Nahrungsquelle zu dienen. Es scheint, dass auch (semi)-kryptische Schwammarten auf eine ausreichende Lichteinstrahlung angewiesen sind, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht ausreichte, um ein Überleben der Fragmente zu gewährleisten. Ausgehend von diesen Ergebnissen erscheint es daher vorteilhaft, dass in einer *ex-situ* Kultivierung von Schwammfragmenten eine Beleuchtung mit Tageslichtstrahlern entsprechend des physiologischen Toleranzbereichs der verwendeten Schwammart(en) und der Länge der Photoperiode, je nach Jahreszeit erfolgt.

Neben der Wassertemperatur und einer ausreichenden Beleuchtung (s. o.), übte auch die initiale Fragmentgröße einen Einfluss auf das Überleben von Schwammfragmenten aus. Je geringer das Volumen eines verwendeten Schwammfragments war (3.2.1.6), desto weniger kortikales Gewebe und aquiferes System (4.1.3) war vorhanden, das benötigt wird, um die Reorganisationsfähigkeit zu erhalten und um effizient Nahrung und Sauerstoff aus dem umgebenden Wasser aufnehmen zu können. Dadurch kam es bei den kultivierten Fragmenten vermutlich zu Nahrungs- und Sauerstofflimitationen, wie von DUCKWORTH *et al.* (1997, 2003a, b), LE PENNEC *et al.* (2002, 2003) und CAMACHO *et al.* (2005, 2006a, b) beschrieben wurde. Diese Limitierung verursachte wahrscheinlich Hungerbedingungen und Anoxie, so dass die meisten Fragmente nach kurzer Zeit abstarben. Aus den erzielten Ergebnissen wird geschlossen, dass ein minimaler Anteil von ca. einem Drittel kortikalem Gewebe an der Gesamtoberfläche eines Fragments scheinbar die Voraussetzung für den Erhalt der Reorganisationsfähigkeit darstellt, der für ein Überleben essentiell ist. Fragmente mit größerem Volumen besitzen vermutlich durch mehr Zellmasse und einen größeren Anteil an kortikalem Gewebe sowie aquiferen Systems eher die Fähigkeit, erlittene Verletzungen zu heilen und sich in Form eines funktionellen Schwammes reorganisieren zu können als kleinere.

Für *S. domuncula* stellt offensichtlich ein Volumen von $\sim 20 \text{ mm}^3$ die minimale Menge an Biomasse dar, um ein Überleben der Fragmente zu sichern, für *A. aerophoba* liegt der Wert scheinbar bei über 20 mm^3 . Es wäre allerdings vorstellbar, dass der minimale Anteil an kortikalem Gewebe und aquiferem System am Volumen eines Schwammfragments von der verwendeten Schwammart abhängig ist, wie von WILKINSON & VACELET (1979) und DUCKWORTH *et al.* (1997) beschrieben wurde und bei anderen Arten eventuell größer sein müsste, als bei *A. aerophoba* oder *S. domuncula*.

Die Ernährung stellte sich als ein sehr wichtiger, bzw. vielleicht sogar den entscheidenden Faktor für den Erfolg einer *ex-situ* Kultur von Schwammfragmenten heraus. In mehreren Untersuchungen (3.2.1.9 - 3.2.1.11) wurde getestet, ob sich Fragmente mit partikulären Futterorganismen und gelösten Substanzen ernähren lassen. Dabei wurde deutlich, dass die Schwammfragmente die partikuläre Nahrung bzw. gelöste Kohlenstoffquelle verwerten konnten und nicht abstarben. Scheinbar fehlten aber Nahrungsbestandteile, um ein nachhaltiges Wachstum der Schwammfragmente auszulösen. Nur für *S. massa* (3.1.3.4) konnte bei gleichzeitiger Verwendung von partikulärem Krebs- und Fischfutter sowie Ethanol, in offener Aquarienkultur, ein Flächenzuwachs von mehr als dreihundert Prozent in einem Jahr erzielt werden (4.1.7, 4.1.7.1). Es blieb allerdings unklar, welche(r) essentielle(n) Bestandteil(e) in den verwendeten Medien fehlte(n), um ein nachhaltiges Wachstum bei allen Schwammarten zu stimulieren und wie ein Kulturmedium für die adäquate Ernährung von Schwammfragmenten zusammensetzt sein sollte. Durch eine starke Erhöhung des DOC im Beckenwasser in geschlossener Kultur konnte bei den Schwammfragmenten kein gesteigertes Wachstum hervorgerufen werden. Es besteht die Vermutung, dass mit dem zudosierten, partikulären Krebs- und Fischfutter (3.2.1.10) verschiedene Substanzen ins Beckenwasser gelangt sein könnten, die essentielle Faktoren für das Wachstum der *S. massa*-Fragmente (4.1.7, 4.1.7.1) darstellen. Möglich wäre auch, dass ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren für das gesteigerte Wachstum der *S. massa*-Fragmente verantwortlich war. Welche Rolle die schwamm-assoziierten Mikroorganismen bei der Nahrungsaufnahme spielten blieb unklar. Es wäre aber denkbar, dass sie für die Aufnahme und Verwertung des DOC verantwortlich sind, wie von WILKINSON & GARRONE (1980) und YAHEL *et al.* (2003) vermutet wurde. Weiterhin könnte es in Becken I (3.1.2) durch die endobenthische Gemeinschaft zu Abbau-, bzw. zu Syntheseprozessen von organischen Verbindungen gekommen sein, die ins Beckenwasser abgegeben wurden. Die freigesetzten Substanzen im Beckenwasser könnten von Mikroorganismen für eine Biomassenproduktion genutzt worden sein, woraus eine erhöhte Abundanz dieser Organismen resultieren würde.

Diese Nahrungsquelle aus Mikroorganismen könnte den Schwammfragmenten für ihre Ernährung zur Verfügung gestanden haben, so dass sie wuchsen. Im Modulbecken H₁ - H₈ (3.1.2) dagegen, könnte es durch das Fehlen einer endobenthischen Gemeinschaft zum Ausbleiben der Synthese- bzw. Abbauprozessen, die für eine Biomassenproduktion ausschlaggebend gewesen wären, gekommen sein. Für die adäquate Ernährung bzw. für die Entwicklung eines Mediums zur *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen ist es deshalb von großer Wichtigkeit, den bzw. die essentiellen Nahrungsbestandteile zu identifizieren, der bzw. die das nachhaltige Wachstum von *S. massa* verursacht haben.

Für die Kultivierung von Schwammfragmenten ist zusammenfassend zu sagen, dass diese Methode der *ex-situ* Kultivierung leicht anwendbar ist und dass viele Schwammarten für eine Fragmentierung geeignet sind (4.1.1). Weitere Schwammarten müssten auf ihre Eignung hin getestet werden. Als Ergebnis der Untersuchungen, welche Faktoren das Überleben und Wachstum von Schwammfragmenten beeinflussen kann festgestellt werden, dass die Wassertemperatur und die Ernährung sehr starken Einfluss ausüben und dass die verwendeten Schwammarten eng begrenzte physiologische Toleranzbereiche gegenüber den verschiedenen, untersuchten Faktoren haben. Für eine breit angelegte *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen sollte daher vorab genau bestimmt werden, welche ökologischen Anforderungen die Arten an die Kultivierungsparameter haben, um optimale Bedingungen bieten zu können. Alle Kultivierungsparameter sollten dabei so nah wie möglich an den Bedingungen liegen, wie sie im natürlichen Habitat vorkommen, um einen dauerhaften und maximalen Kultivierungserfolg zu erzielen.

5.3 Multizelluläre Reaggregate

Als eine weitere Kultivierungsmethode, neben der Kultivierung von Schwammfragmenten (5.2), wurden multizelluläre Reaggregate, MZRA, durch chemische und mechanische Dissoziation von Schwammgewebe hergestellt (3.2.2.1). Der Bildungsprozess von multizellulären Reagregaten aus dissoziierten Zellen der Schwammarten *A. polypoides* (3.1.3.2) und *S. domuncula* (3.1.3.3) unterschied sich entgegen den Resultaten von KÜHNLE (2003) und SIPKEMA *et al.* (2003b) kaum. Dabei muss betont werden, dass sich die gewonnenen Ergebnisse für die Herstellung und Kultivierung von MZRA einer Schwammart nicht uneingeschränkt auf alle Schwammarten übertragen lassen, sondern dass das Dissoziations- und Reaggregationsverhalten vermutlich artspezifisch ist. In weiteren Untersuchungen wurde getestet, welche Schwammarten für die Herstellung von MZRA geeignet sind und wie der Bildungsprozess bzw. das Wachstum der MZRA beeinflusst werden kann. Durch Filtration, der durch mechanische Dissoziation gewonnenen Zellsuspension von *A. polypoides* und *S. domuncula*, sollten Spicula und Gewebefetzen > 50 µm entfernt werden. Ob diese Fetzen und Spicula die Bildung von MZRA stören, konnte nicht festgestellt werden. Bei der Aufnahme von Fotos der MZRA (3.2.1.3), konnte nach mehreren Wochen Kultivierung, trotz des Filtrationsschrittes, eine nicht unerhebliche Menge Spicula im Gewebe der MZRA festgestellt werden. Es wäre denkbar, dass die Spicula trotz der Filtration mit in die Probe gelangt sind, da sie jedoch in einer größeren Anzahl auftraten, ist diese Vermutung eher unwahrscheinlich. Das Vorhandensein einer größeren Menge Spicula könnte deshalb darauf hinweisen, dass diese nach der Reaggregation der dissoziierten Schwammzellen zu MZRA gebildet wurden, was einen aktiven Bildungsprozess und eine Morphogenese in Richtung der Formierung eines Jungschwammes im Kultivierungsansatz belegen würde. Durch die Filtration könnten allerdings auch Fraktionen mit einem Zelldurchmesser von > 50 µm aus der Suspension ausgeschlossen worden sein, so dass sie nicht mehr als Bestandteil zur Bildung von MZRA zur Verfügung standen. Möglicherweise stellen aber gerade diese Zellfraktionen die essentiellen Bausteine des Schwammgewebes dar und ihr Fehlen verursachte eine verringerte Bildungsrate und Überlebensdauer der MZRA, verglichen mit den Ergebnissen von SIPKEMA *et al.* (2003b), der MZRA der gleichen Schwammarten ohne Filtrationsschritt über einen Zeitraum von 6 - 9 Monate am Leben erhalten konnte.

Durch die Inkubation der Zellsuspensionen auf einem Thermoschüttler bei niedriger Umdrehungszahl kam es scheinbar zur einer Erhöhung der Zell-Zell-Kontakte, so dass sich vermehrt und in kürzerer Zeit MZRA bildeten, als in anderen Untersuchungen (CUSTODIO *et al.* 1998, SIPKEMA *et al.* 2003b). Gleich lautend zu den Ergebnissen von ZHANG *et al.* (2003) konnte durch eine Erhöhung des Schwammgewebes, aus dem die Zellen dissoziiert wurden, oder durch eine Erhöhung der Initial-Zellzahl, keine Auswirkungen auf die Bildungsrate und -geschwindigkeit der MZRA und deren Überlebensrate festgestellt werden. Dies traf sowohl für vergleichende Versuche innerhalb einer Art, als auch im Vergleich zwischen *A. polypoides* und *S. domuncula* zu.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben die empirische Feststellung, dass die Bildung von MZRA aus dissoziierten Zellen lediglich vom Anteil Pinacoderm, das die Gewebeprobe hatte die dissoziiert wurde, abhängig war. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von SIPKEMA erzielt (SIPKEMA, pers. Mitteilg.).

Von den untersuchten Kultivierungsparametern, konnte nur ein Einfluss der Wassertemperatur auf die Bildungsrate und das Überleben der MZRA festgestellt werden. Bei Temperaturen von mehr als 18 °C wurden weniger MZRA gebildet bzw. starben die MZRA schneller ab, als bei kühleren Temperaturen. Außerdem wurde durch höhere Temperaturen (> 20 °C) die Verbreitung von Kontaminanten im Medium und im Gewebe der MZRA gefördert, die das Gewebe als Nahrungsquelle nutzten und die somit für das Absterben der MZRA (mit-)verantwortlich waren. Ausgehend von diesen Ergebnissen, wäre für die Kultivierung von MZRA die Wahl einer niedrigeren Wassertemperatur von < 20 °C von Vorteil.

Eine Untersuchung, ob eine Ernährung der MZRA mit partikulärer Nahrung realisierbar ist (3.2.2.2), war aufgrund des Umstands nicht möglich, dass die entstandenen MZRA kein aquiferes System ausbildeten. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Phagozytose von durch das aquifere System eingestrudelter Nahrungspartikel der Hauptpfad zur Aufnahme von Nahrung in Schwämmen ist (WILLENZ *et al.* 1986, VAN DE VYVER *et al.* 1990). Sofern eine Aufnahme von partikulärer Nahrung durch Ineffizienz des aquiferen Systems der MZRA nicht möglich ist, haben Schwammzellen bedingt die Fähigkeit, durch die Aufnahme von gelösten Substanzen zu überleben (SOUTHWARD & SOUTHWARD 1970, 1972, SEPERS 1977, CAMACHO *et al.* 2006a, b). Im Schwammgewebe kommen spezielle, sphäkulose Zellen vor, die Glycogen und Lipide enthalten (BOURY-ESNAULT 1977).

Diese sphäkulösen Zellen können den Inhalt ihrer Nahrungsvakuolen ergießen und so die umliegenden Zellen innerhalb des multizellulären Reaggregats über einen nicht genauer determinierten Zeitraum ernähren (GARRONE 1978). MÜLLER *et al.* (1999) unterstreicht daneben die Tatsache, dass sich Zellen in MZRA, auch durch Phagocytose von Nachbarzellen bzw. Zelltrümmern ernähren können, wobei die Zellen in den MZRA in beiden Fällen nach kurzer Zeit durch Nahrungslimitation absterben, vergleichbar mit den Ergebnissen von CUSTODIO *et al.* (1998) und NICKEL (2001). Aus diesem Blickwinkel heraus ist ein Überleben ungefütterter MZRA über einen Zeitraum von einigen Wochen nachvollziehbar, wobei deren Absterben durch „Selbstveratmung“ der vorhandenen Zellen die logische Folge wäre.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche (3.2.2.2) wurde versucht ein Kulturmedium bzw. eine Ernährungsstrategie zu bestimmen, um MZRA dauerhaft in *ex-situ* Kultur am Leben zu erhalten. Entgegen den Ergebnissen von MÜLLER *et al.* (1999), KRASKO *et al.* (2000, 2002), SCHRÖDER *et al.* (2003), LE PENNEC (2003) und MÜLLER *et al.* (2004a, b), konnte keine Größenzunahme der MZRA durch die Zudosierung von Si- oder Fe-Ionen erzielt werden. Auch die in ASW ohne Zusätze von gelösten Substanzen kultivierten MZRA erreichten gleiche Durchmesser und Überlebensraten. Prinzipiell sollte das verwendete Kulturmedium alle für eine adäquate Ernährung der MZRA essentielle Bestandteile in optimaler Konzentration enthalten und gleichzeitig so wenig wie möglich Angriffsfläche für eine mikrobielle Kontamination bieten, wie von FRESHNEY (2000) empfohlen. Durch die Nutzung eines mit verschiedenen Substanzen angereichertem Kulturmedium (3.2.2.2) war das Risiko einer Kontamination mit Mikroorganismen stark erhöht (OSINGA *et al.* 1999a, b). Trotzdem wurde auf den Einsatz von chemischen Agenzien, z.B. Penicillin, Gentamycin, oder Nistatin im Kultivierungsmedium bewusst verzichtet. RINKEVICH (1999), SIPKEMA *et al.* (2003a) und ZHANG *et al.* (2003) beschreiben, dass verwendete Antibiotika und Antifunghizide im Kulturmedium schon in geringen Konzentrationen eine nachhaltig negative Wirkung auf die assoziierten Symbionten der Schwämme und damit auch auf Vitalität und Reaggregationsverhalten der Schwammzellen haben können. Eine Möglichkeit zur Nahrungsversorgung könnte in der Verwendung eines Mediums, das aus aufgeschlossenen Schwammzellen oder aus anderen marinen Organismen gewonnen wird, bestehen. Ein derartiges Medium würde alle relevanten essentiellen Nahrungsbestandteile enthalten, wie von CAMACHO *et al.* (2006a, b) beschrieben und könnte zur anfänglichen Kultivierung von MZRA, bis zur Bildung eines effizienten, aquiferen Systems, eingesetzt werden.

5.4 Gemmulae

Die Auskeimung von Gemmulae und deren Formation zu Jungschwämmen war die dritte untersuchte Kultivierungsmethode. Nachdem Gemmulae unter Deckgläschen in ASW ausgekeimt waren (3.2.3.1) und sich zu Jungschwämmen entwickelt hatten (4.3.1), wurde gezielt versucht durch Veränderung der Wassertemperatur, Beleuchtung und der Versorgung mit gelöster und partikulärer Nahrung, die Keimung und die Entwicklung der sich bildenden Jungschwämme zu beeinflussen.

In den Versuchen zur Auskeimung von Gemmulae (3.2.3.2) kam es bei einer Wassertemperatur von $< 15\text{ °C}$ nicht zur Auskeimung, wobei die Gemmulae über mehr als 6 Monate keimfähig blieben (4.3.2). Eine Wassertemperatur von $15 - 18\text{ °C}$ schien optimal für die Auskeimung und Kultivierung von Gemmulae zu sein. Bei diesen Temperaturen erfolgte zwar eine langsamere Auskeimung als bei höheren Temperaturen (Abb. E 17), aber nur bei niedrigeren Temperaturen kam es zur Bildung von Jungschwämmen, die nach einiger Zeit deutliche Anzeichen der Bildung eines aquiferen Systems zeigten. Empirisch konnte festgestellt werden, dass die Lebensdauer und die Vitalität der sich bildenden Jungschwämme bei einer Wassertemperatur von $< 20 - 22\text{ °C}$ zunahm. Gemmulae die bei $22 - 25\text{ °C}$ kultiviert wurden keimten deutlich schneller aus, starben aber schon nach kurzer Zeit wieder ab und bildeten keine Jungschwämme. SIPKEMA *et al.* (2004) zeigen, dass die Sterberate von Gemmulae- bzw. Schwammzellen, entsprechend der physiologischen Toleranz der jeweiligen Art, proportional zur Temperatur zunimmt. Vergleichbare Beobachtungen, wurden auch von FELL (1974) für die marinen Schwammarten *Haliclona loosanoffi* und *H. oculata* gemacht. Entsprechend diesen Ergebnissen sollte die Wassertemperatur einer *ex-situ* Kultur für ein Auskeimen von Gemmulae, in Abhängigkeit von der verwendeten Schwammart, nach Möglichkeit der Temperatur im natürlichen Habitat entsprechen.

Da die gebildeten Jungschwämme mit einer Dauer von $\sim 3\frac{1}{2} - 5$ Monaten nur verhältnismäßig kurz am Leben erhalten werden konnten, könnte durch ein Zusammenspiel der Temperatur und mangelnder Ernährung verursacht worden sein. Versuche die Jungschwämme mit partikulärer Nahrung, mit einem Komplexmedium sowie gelösten Substanzen zu ernähren, erbrachten keine positiven Ergebnisse. So lange im Gewebe der auskeimenden Gemmulae kein effizientes, aquiferes System ausgebildet wurde, konnte partikuläre Nahrung vermutlich nur sehr begrenzt, bzw. nicht aufgenommen werden. Warum sich die Jungschwämme trotz hohem DOC-Gehalt nicht weiterentwickelten und wieder abstarben, konnte nicht geklärt werden.

In den Gemmulae, die bei Temperaturen von $> 18\text{ °C}$ kultiviert wurden, kam es ebenfalls nicht zur Bildung eines aquiferen Systems, so dass auch hier kaum eine Aufnahme von partikulärer Nahrung möglich gewesen wäre. Zusätzlich könnten durch die höhere Temperatur die gespeicherten Reservestoffe in den Gemmulae (Abb. G 7) viel schneller verbraucht worden sein als bei kälteren Temperaturen, was eine umfangreiche Gewebebildung verhinderte, woraus vermutlich auch die ausbleibende Bildung von Jungschwämmen resultierte. Der vermutete, beschleunigte Verbrauch der Reservestoffe könnte außerdem als Erklärung für die Beobachtung dienen, dass bei beginnender Keimung die Gemmulae relativ schnell im Umfang schrumpften.

Ein Einfluss von Licht auf die Auskeimung von Gemmulae konnte nicht bestimmt werden. Unklar blieb, warum sich in Versuch 3.2.3.1, nicht aber im 24-Loch-Platten-Versuch 1 (3.2.3.5) Jungschwämme aus auskeimenden Gemmulae in ASW bildeten. Möglicherweise war nur in Meerwasser aus dem natürlichen Habitat (RMW) die chemische Zusammensetzung entsprechend den ökologischen Ansprüchen der Gemmulae gegeben. In den beiden anderen Kulturmedien (ASW, SMW) fehlten möglicherweise ein oder mehrere Bestandteile, die für die Bildung von Jungschwämmen essentiell sind bzw. könnte bspw. das Redfield-Verhältnis (REDFIELD *et al.* 1963) in suboptimale Bereiche verschoben gewesen sein, so dass die Auskeimung gehemmt wurde. Denkbar wäre auch, dass sich die verwendeten Gemmulae in einem Zustand der Dormanz befanden und nicht auskeimten und somit das Medium keinerlei Effekt auf die Auskeimung gehabt hätte. Bedingt durch die erzielten Ergebnisse im 24-Loch-Platten-Versuch 2 (4.3.5), dass Gemmulae die einem bzw. mehrmaligem Kälteimpuls ausgesetzt wurden über lange Zeiträume hinweg nicht keimten kann davon ausgegangen werden, dass sich die eingesetzten Gemmulae im Zustand der Dormanz befanden. Eine kurze Inkubation bei niedrigen Temperaturen (3.2.3.5) zeigte keinen Effekt auf die Auskeimrate, wie von FELL (1987) oder BOUTSELIS *et al.* (1990) für *Haliclona* sp. und *Eunapius fragilis* beschrieben wurde. Auch durch die mehrmalige und mehrwöchige Einwirkung niedriger Temperaturen konnte die Keimung nicht angeregt werden. FELL (1995) beschreibt, dass bei besonders schnell erwärmten Gemmulae die Auskeimrate höher war, als bei vergleichsweise langsam erwärmten. Trotz schneller Temperierung der Gemmulae nach der mehrwöchigen Inkubation bei $4 - 5\text{ °C}$ auf $22 - 25\text{ °C}$, konnte kein Auskeimen erzielt werden. Möglicherweise befanden sich die eingesetzten Gemmulae in einem besonders tiefen Zustand der prospektiven Dormanz, so dass ein zeitlich stark ausgedehnter Tieftemperaturimpuls nötig gewesen wäre, um die Auskeimung zu initialisieren.

Es könnte allerdings auch der Fall sein, dass ein anderer Faktor bzw. eine Kombination von mehreren hemmenden Faktoren für eine ausbleibende Auskeimung verantwortlich sein könnte, die nicht bestimmt werden konnten.

Vor dem Hintergrund der erzielten Ergebnisse der Kultivierung von Gemmulae kann festgestellt werden, dass ein gezieltes Auskeimen von Gemmulae der Schwammart *S. domuncula* innerhalb eines bestimmten Zeitraumes oder zu einem bestimmten Zeitpunkt, durch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen oder der Anwendung von Tieftemperaturimpulsen zum Brechen der Keimruhe, nicht möglich war.

Sofern es möglich wäre Gemmulae innerhalb eines bestimmten zeitlich Rahmens auskeimen zu lassen und die entstehenden Jungschwämme adäquat zu ernähren, könnte diese Form der *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen dazu dienen, die Schwammforschung von einer Wildernte relativ unabhängig zu machen, um zu jedem Zeitpunkt funktionelle Schwämme als Modellorganismus zur Verfügung stellen zu können, bspw. um verschiedene Untersuchungen, z.B. die Testung von Kulturmedien zur Ernährung, oder Veränderungen der Diversität und Abundanz der schwammassoziierten Mikroorganismen über längere Kultivierungszeiträume zu testen.

5. 5 Immobilisierung von Schwammzellen

Die vierte untersuchte Kultivierungsmethode, die Immobilisierung von Zellen, ist in verschiedenen Bereichen eine vielfach angewandte und gut untersuchte Methode (HÜBNER 1998). Um Schwammzellen zu immobilisieren, wurde eine derartige Methode bisher aber nur einmal eingesetzt (WIJFFELS 2001). Die Methode wurde als gut anwendbar beschrieben und bei den immobilisierten Zellen eine, wenn auch geringe Proliferation nachgewiesen (NICKEL, persönl. Mitteilg.). Allerdings wurde in diesen Untersuchungen kein Identitätsnachweis der Zellen vorgenommen, so dass eine fälschliche Kultivierung von schwammähnlichen Organismen, die als Kontamination der Probe mit in die Kultur gelangt sind, anstatt der Schwammzellen nicht ausgeschlossen werden kann.

Als ein Ergebnis der mit immobilisierten Zellen von *A. polypoides* und *S. domuncula* durchgeführten Untersuchungen, kann die Frage (2.3.5.3a), ob die dissoziierten Schwammzellen die Immobilisierung überlebten, positiv beantwortet werden. Dagegen konnte die Frage, wie lange die immobilisierten Schwammzellen nach der Immobilisierung noch am Leben waren (2.3.5.3b), nicht eindeutig geklärt werden.

Der angewendete BrdU-Assay, zum Nachweis einer Proliferation und somit der Vitalität der Zellen nach der Immobilisierung, verlief nur wenige Male mit positiven Ergebnis, so dass eine eindeutige Aussage kaum möglich ist. Eine Zellproliferation konnte nur in nicht immobilisiertem Gewebe und in immobilisierten Zellen in Dünnschnitten von KA-Immobilisat-Kugeln festgestellt werden. Der Nachweis einer Proliferation in Zellsuspensionen oder Dünnschnittpräparaten von Immobilisat-Kugeln, die bereits einige Tage oder Wochen kultiviert worden waren, gelang nicht. Es wird aber aus den Erfahrungen der Versuche, MZRA und auskeimende Gemmulae mit gelösten Substanzen zu ernähren (4.2.2, 4.3.3) als durchaus vorstellbar angesehen, dass die immobilisierten Schwammzellen einige Tage oder Wochen überleben können.

In den Bemühungen die Integration von BrdU in neusynthetisierte DNA nachzuweisen, wurden Versuche unternommen, ob sich durch eine Erhöhung des Anteils der Zellsuspension in der Tropflösung (3.2.4) eine Erhöhung der Zell-Zell-Interaktionen erreichen ließe, wodurch es möglicherweise zu einer Erhöhung der Zellteilungsrate kommen würde. Dabei wurde festgestellt, dass der Anteil der Zellsuspension in der Tropflösung nicht beliebig gesteigert werden kann.

Durch eine Verschiebung des Verhältnisses Zellsuspension : Matrix wurden die Immobilisat-Kugeln instabil und zerfielen schon nach kürzester Zeit, bzw. kam es nicht mehr zur Bildung von Immobilisaten, weil sich die Tropflösung nicht mehr zu Kugeln verfestigte.

Durch den Einsatz von höheren BrdU-Konzentrationen, konnte kein erhöhter Prozentsatz proliferierender, „BrdU-positiver“ Zellen im Präparat detektiert werden. Eine Erhöhung der Konzentration des primären oder sekundären Antikörpers erbrachte ebenfalls kein (stärkeres) Signal für eine BrdU-Integration. Die Anzahl der Zellen die erfolgreich BrdU in neu gebildete DNA integriert hatten, war nach 24 h Inkubationszeit äußerst gering. Ähnliche Ergebnisse beschreiben CUSTODIO *et al.* (1998), die in MZRA bzw. losen Aggregaten aus dissoziierten Zellen einen Prozentsatz BrdU-positiver Zellen nach 24 h Inkubation von 6,5 % fanden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die gewählte Inkubationszeit der Immobilisate von 24 h in 10 µmol BrdU zu kurz war und dadurch keine, oder nur eine sehr geringe Integration von BrdU in neusynthetisierte DNA stattgefunden hat. Daraufhin wurde angenommen, dass die immobilisierten Zellen, aufgrund ihrer sehr geringen Proliferationsrate, vermutlich über Zeiträume von mehreren Tagen in BrdU inkubiert werden müssten, um ein detektierbares BrdU-Signal zu erzielen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von Immobilisaten in BrdU von 24 auf 72 bis 144 h erbrachte aber keine Verbesserung der Resultate. Deshalb wird davon ausgegangen, dass möglicherweise Probleme in der Probenvorbereitung bzw. bei der Detektion von BrdU-positiven Zellen in den Dünnschnittpräparaten auftraten, die bis zum Versuchsende nicht geklärt und ausgeräumt werden konnten. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass sich die immobilisierten Zellen in den Immobilisat-Kugeln nicht teilten und durch Nahrungsmangel abstarben. Durch das Absterben der Zellen und anschließende Zelllyse, könnte es auch zum beobachteten Problem der Auflösung der Immobilisat-Kugeln gekommen sein (4.4.1).

Um die Frage nach der Identität der immobilisierten Zellen zu klären (2.3.5.3c), wurden Primersysteme für *A. polypoides* und *S. domuncula* entwickelt (3.2.4.4). Mit Hilfe dieser Primer wurden die immobilisierten Zellen in den KA- bzw. CS-Immobilisat-Kugeln als Schwammzellen identifiziert, so dass eine fälschliche Kultivierung, oder Kontamination mit amplifizierbarer DNA von schwammähnlichen Organismen nahezu ausgeschlossen werden kann. Für die in KA immobilisierten Zellen, die vor der Immobilisierung durch Hitze abgetötet worden waren, konnte keine Veränderung der Bandenstärke mit zunehmender Kultivierungsdauer bestimmt werden. Dadurch scheint belegt, dass der Nachweis von vorhandener DNA in Immobilisat-Kugeln mittels PCR kein geeignetes Mittel darstellt, um einen Vitalnachweis der Zellen über die Kultivierungsdauer führen zu können.

5.6 Résumee

In der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Anstrengungen unternommen, um Methoden zur *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen, zu entwickeln (Immobilisierung von dissoziierten Schwammzellen, 2.2.5), zu untersuchen und zu optimieren (Schwammfragmente, 2.2.2, multizellulären Reaggregate, MZRA, 2.2.3 und Gemmulae, 2.2.4). Die Immobilisierung von Schwammzellen ist dabei eine viel versprechende Methode, die bisher erst einmal angewendet wurde und die großes Potential für die biotechnologische Produktion von Schwammbiomasse in Bioreaktoren bietet. Durch die, mit den optimierten Kultivierungsmethoden durchgeführten Untersuchungen, konnten grundlegende Aspekte und Parameter bestimmt werden, welche die Überlebensrate und das Wachstum von Schwämmen beeinflussen. Die Untersuchungen erforderten dabei meistens sehr lange Zeiträume, um eine messbare Veränderung bzw. Effekte bei den Schwämmen festzustellen.

Durch ein Screening wurden geeignete Schwammarten für die verschiedenen Kultivierungsmethoden bestimmt. Schwammfragmente verschiedener mediterraner Arten, multizelluläre Reaggregate und Gemmulae wurden in für die jeweiligen Kultivierungsmethode konzipierte Träger (Abb. M 7 und M 10), welche das Wachstum nahezu zweidimensional beschränken eingesetzt, in eigens entwickelten Kultivierungs-Modulen (3.2.1.2) eingebracht und unter den verschiedenen Versuchsbedingungen kultiviert. In allen durchgeführten Versuchen mit Schwammfragmenten, MZRA, Gemmulae und der Immobilisierung von dissoziierten Schwammzellen, zeichneten sich deutliche Unterschiede zwischen den Arten und auch innerhalb einer Art, für die jeweilige Kultivierungsmethode und -bedingungen ab.

Alle untersuchten Kultivierungsmethoden zeigten in Abhängigkeit von den verwendeten Schwammarten ein großes Potential, um möglicherweise für eine *ex-situ* Kultivierung von Schwammbiomasse eingesetzt zu werden. Sofern die noch bestehenden Probleme der Kultivierungsmethoden gelöst würden, könnte jede der untersuchten Methoden dazu eingesetzt werden, Schwämme dauerhaft zu kultivieren und nachhaltig Schwammbiomasse zu produzieren.

In der Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Untersuchungen erscheint die Kultivierung von Schwammfragmenten gegenüber den anderen untersuchten Kultivierungsmethoden als besonders empfehlenswert, da sie aufgrund der höheren Überlebensfähigkeit, des hohen Regenerationspotentials und der höheren Wachstumsraten der Fragmente mehr Erfolg in der Langzeitkultivierung verspricht. Diese Aussage steht in Einklang mit den Ergebnisse und Empfehlungen von HARSHA *et al.* (1983), RINKEVICH & BLISTO (1998) und DE CARALT *et al.* (2003). Für alle untersuchten Kultivierungsmethoden bleiben weiterhin Fragen bestehen, wie die optimale *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen aussehen sollte, die diese Arbeit nicht klären konnte. Als das größte Problem der *ex-situ* Kultivierung von Schwammbiomasse in allen untersuchten Kultivierungsansätzen wird die Entwicklung eines Nährmediums zur adäquaten Ernährung der Schwämme angesehen, welche die grundlegende Voraussetzung für eine dauerhafte *ex-situ* Kultivierung von Schwämmen darstellt.

Die für die Schwammfragmente, sowie für die Dokumentation der Gewebeveränderung von MZRA und Gemmulae angewendete Methode, der Flächenbestimmung durch zweidimensionale Photos (3.2.1.3), war einfach anwendbar, sehr verlässlich, schnell durchführbar, kostengünstig und hatte keine nennenswerten, negativen Auswirkungen auf das Überleben der kultivierten Schwämme. Während der Kultivierung im Schwammgewebe entstandene Hohlräume und innere Gewebedegeneration konnten durch das erzwungene zweidimensionale Wachstum in den Kultivierungsträgern (3.2.1.1) leicht erkannt und derartige Schwammproben aus der Versuchsbetrachtung ausgeschlossen werden. Eine Über- oder Unterbestimmung des Wachstums sollte daher kaum mehr auftreten. Somit ist eine solide Methode der einfachen Wachstum- und Biomassenbestimmung gefunden worden. Eine Volumen bzw. Biomassenbestimmung mittels 3-D Scans (GOSLAR 2007) oder Computertomographie wäre als ideal anzusehen, ist aber aufgrund der hohen Kosten des technischen Equipments und der eingeschränkten Verfügbarkeit eine kaum anwendbare Methode (NICKEL *et al.* 2004).

5.7 Ausblick

Eine erfolgreiche und umfangreiche *ex-situ* Kultivierung von Schwammfragmenten, MZRA, Gemmulae oder Immobilisaten, könnte die Versorgungslücke zwischen Wildernte und benötigter Menge Schwammbiomasse zur Extraktion von Sekundärmetaboliten schließen. Allerdings ist festzustellen, dass die meisten Schwamm-Sekundärmetabolite nur im Fall einer Verletzung als Folge des Wundheilungsprozess, bzw. unter anderen Stressbedingungen gebildet werden, was die Gestaltung der Kultivierungsparameter erschwert (DUCKWORTH & BATTERSHILL 2003a, b). Sofern es gelänge die Kultivierungsbedingungen entsprechend den Anforderungen der verwendeten Schwammarten optimal zu gestalten, bzw. die Bildung der Sekundärmetabolite künstlich anzuregen, könnte dies zu einer Anreicherung der gesuchten und gewünschten Metabolite im Schwammgewebe führen, wie von OSINGA *et al.* (1999a) beschrieben. Weiterhin muss geklärt werden, welche Anforderungen Schwämme in Bezug auf eine ausgewogene Nahrungsversorgung haben und welche Nahrungsbestandteile im Kulturmedium essentiell sind, um die Schwämme dauerhaft zu kultivieren. Dadurch und durch die Bestimmung der optimalen Nahrungsmenge der eingesetzten Schwämme, könnte die Kultivierung bzw. Produktion von Futterorganismen, die mit sehr großem technischem und zeitlichem Aufwand erfolgt, optimiert und ökonomischer gestaltet werden.

Ein Einsatz von immobilisierten Schwammzellen als Kultivierungsmethode von Schwammbiomasse in Bioreaktoren erscheint nur sinnvoll, wenn es gelänge, die dauerhafte Stabilität der KA- und CS-Immobilisat-Kugeln zu gewährleisten. Dabei müsste der Nachweis erbracht werden, dass die Schwammzellen die Immobilisierung überleben und weiterhin bioaktive Substanzen bilden. Alternativ zur Verwendung eines BrdU-Assays wäre es vorstellbar, für den Identitäts- und den Vitalitätsnachweis der immobilisierten Schwammzellen bestimmte Stoffwechselprodukte oder Metabolite der Zellen nachzuweisen bzw. artspezifische Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungssonden (FisH) zu entwickeln (BELARBI *et al.* 2003). Durch den Einsatz von FisH-Sonden, könnten Vital- und Identitätsnachweis deutlich einfacher und spezifischer werden.

6. Formeln

6.1 Formeln zur Bestimmung der Fragmentfläche / ~Flächenveränderung und der spezifischen Wachstumsrate

Die Veränderung der Fragmentfläche wurde mit durch Auswertung von zweidimensionalen Fotos mit Computerprogramm, Alpha Ease, vers. 3.21 (Biozym, Hessisch-Oldendorf) bestimmt. Dazu wurde die Messung der Fragmentfläche (A) für jedes Fragment dreimal wiederholt ($A_{1...3}$) und der Mittelwert aus diesen Messungen bestimmt (\bar{x}). Die Fläche jedes Fragments A_e ($e = 1, 2...n$) wurde auf ein Referenzmaß von 1 cm², dass für jedes Fragment separat gemessen wurde normiert (TURON *et al.* 1998, DE CARALT *et al.* 2003).

$$A_e = \bar{x} (A_1 + A_2 + A_3) \quad (1)$$

Aus den Werten (1) wurden die Standardabweichung (SD) und die absolute Veränderung der Fläche jedes Fragments (ΔA_e) zum Zeitpunkt i ($i = 0, 1...n$ Tage) im Vergleich zur Fläche des Fragments bei der vorherigen Messung ($A_{e,j}$) berechnet (2).

$$\Delta A_e = A_{e,i} - A_{e,j} \quad (2)$$

Die prozentuale Flächenveränderung FV [%] berechnet sich nach folgender Formel:

$$FV = \frac{(A_{e,i} - A_{e,j})}{(A_{e,j}/100)} \quad (3)$$

Die spezifische Wachstumsrate (WR) der Fragmente wurde berechnet, indem von jedem Wert der Fläche ($A_{e,i}$) zum Zeitpunkt i ($i = 0, 1...n$ Tage) die Fläche zum Zeitpunkt j ($A_{e,j}$) subtrahiert, durch die Fläche des Fragments zum Zeitpunkt j und durch die Anzahl der Zeiteinheiten (Δt) dividiert wurde (FRANCIS *et al.* 1982).

$$WR = \frac{(A_i - A_j) / A_j}{\Delta t} \quad (4)$$

Die berechneten Werte für die spezifische Wachstumsrate wurden in Abhängigkeit von der Versuchsdauer graphisch dargestellt (Abb. E 14).

7. Literaturverzeichnis

7.1 Referenzen

- Aiello** A., Fattorusso E., Menna M. & Pansini M. (1995) Chemical analysis of the sponge *Suberites massa* coming from the lagoon of Venice: Isolation of a new diacetylenic carotenoid. *J. Prakt. Chem.*, 337: 397-400.
- Alberts** B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff K.R. & Walter P. (2005) Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 908p.
- Amui-Vedel** A.-M., Hayward P.J. & Porter J.S. (2007) Zooid size and growth rate of the bryozoan *Cryptosula pallasina* (Moll) in relation to temperature, in culture and in its natural environment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 353: 1-12.
- Ankel** W.E. & Eigenbrodt H. (1950) Über die Wuchsform von *Spongilla* in sehr flachen Räumen. *Zoologischer Anzeiger* 145: 195-204.
- Arillo** A., Bavecstrello G., Burlando B. & Sará M. (1993) Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges - a possible mechanism. *Mar. Biol.*, 117: 159-162.
- Arndt** W. (1933) Haltung und Aufzucht von Meeresschwämmen. In: Abderhalden (ed) Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. IX, Teil 5: 443-464.
- Atkinson** M. J. & Bingman C. (1997) Elemental composition of commercial sea salts. *J. Aquacult. and Aquatic Sci.*, Vol. VIII (2): 39-43.
- Avant** P. (2005) *Suberites massa*. A sponge. Marine Life Information Network: Biology and sensitivity key information sub-program (online). Marine Biological Association of the UK.
- Ax** P. (1996) Multicellular animals: A new approach to the phylogenetic order in nature. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 71p.
- Ayling** AL (1980) Patterns of sexuality, asexual reproduction and recruitment in some subtidal marine Demospongiae. *Biol. Bull.*, 158: 271-282.
- Ayling** A.M. (1981) The role of biological disturbance in temperate subtidal encrusting communities. *Ecology*, 62: 830-847.
- Ayling** A.M. (1983) Growth and regeneration rates in thinly encrusting Demospongiae from temperate waters. *Biol. Bull.*, 165: 343-352.
- Bachinski** N., Koziol C., Batel R., Labura Z., Schröder H.C. & Müller W.E.G. (1997) Immediate early response of the marine sponge *Suberites domuncula* to heat stress: Reduction of trehalose and glutathione concentrations and glutathione S-transferase activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 210: 129-141.
- Bai** R., Paull K.D., Herald Ch.L., Malspeis L., Pettit G.R. & Hamel E. (1991) Halichondrin B and Homohalichondrin B, marine natural products binding in the Vinca domain of Tubulin. *J. Biol. Chem.*, 266(24): 15882-15889.
- Battershill** C.N. & Bergquist PR (1990) The influence of storms on asexual reproduction, recruitment, and survivorship of sponges. In: Rützler (ed) New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington, DC: 397-403.

-
- Bayer K.**, Schmitt S. & Hentschel U. (2007) Microbial nitrification in Mediterranean sponges-possible involvement of ammonium-oxidizing Betaproteobacteria. Porifera Research - Biodiversity, Innovation and Sustainability. Proceedings of the 7th International Sponge Symposium, Buzios, Brazil.
- Bayer K.**, Schmitt S. & Hentschel U. (2008) Physiology, phylogeny and *in-situ* evidence for bacterial and archeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Environment. Microbiol., EMI-2007-0733.R1.
- Beer S.** & Ilan M. (1998) *In-situ* measurements of photosynthetic irradiance responses of two Red Sea sponges growing under dim light conditions. Mar. Biol., 131: 613-617.
- Belarbi E.H.**, Ramirez Dominguez M., Ceron Garcia M., Contreas Gomez F., Camacho F. & Molina Grima E. (2003) Cultivation of explants of the marine sponge *Crambe crambe* in closed systems. Biomol. Eng., 20: 333-337.
- Bell A.H.**, Bergquist P.R. & Battershill C.N. (1999) Feeding biology of *Polymastia croceus*. Mem. Queensl. Mus., 44: 51-56.
- Bergbauer M** (2002) Schwämme. Teil 1: Fenster in die Vergangenheit. Das Aquarium, 398: 46-47.
- Bergmann W.** & Feeney R.J. (1951) Contribution to the study of marine sponges. The nucleosides of sponges. J. Org. Chem., 16: 981-987.
- Bergquist P.R.** (1978) *Sponges*. Hutchinson and Company, London: 268p.
- Bidder G.P.** (1923) The relation of the forms of a sponge to its current. Q. J. Microsc. Sci., 67(2): 293-323.
- Binder M.** (2007) Entschlüsselung des Carotinoid-Metabolismus im marinen Schwamm *Suberites domuncula*. Dissertation, Universität Mainz.
- Blunt J.W.**, Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2004) Marine natural products. Natural Products Report, 21: 1-49.
- Blunt J.W.**, Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2006) Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 23(1): 26-78.
- Blunt J.W.**, Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2008) Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 25: 35-94.
- Bohlmann J.T.**, Schneider C., Andresen H. & Buchholz R. (2002) Optimierung des Herstellungsprozesses von Natrium-Cellulosesulfat (NaCS) zur Mikroverkapselung von Zellkulturen. Chemie Ingenieur Technik, 74(3): 359-363.
- Bonasoro F.**, Wilkie I.C., Bavestrello G., Cerrano C. & Carnevali M.D.C. (2001) Dynamic structure of the mesohyl in the sponge *Chondrosia reniformes* (Porifera, Demospongiae). Zoomorphology, 121(2): 109-121.
- Borojevic R.** (1970) Différenciation cellulaire dans l'embryogenèse et morphogènes chez les spongiaires. In: Fry (ed) The biology of Porifera. Acad. Press, London: 467-490.
- Borojevic R.** (1971) Le comportement des cellules d'éponges lors des processus morphogénétiques. Ann. Biol., 10: 533-539.

-
- Borowitzka** M.A., Hinde R. & Pironet F. (1988) Carbon fixating by the sponge *Dysidea dautzenbergherbacea* and its endosymbiont *Oscillatoria spongelliae*. In: Choat (ed) Proc. 6th Int. Coral Reef Symp., Townsville. Symposium Executive Committee: 151-155.
- Boury-Esnault** N. & Rützler K (1997) Thesaurus of sponge morphology. Smithsonian contributions to zoology. Smithsonian Inst. Press. Washington DC, USA: 596p.
- Boutselis** N.J., Fell, P.E. & Loomis S.H. (1990) Low temperature tolerance of the gemmules of *Eunapius fragilis*. J. Exp. Zool., 255: 125-129.
- Bräuner** T. (1987) Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum maligner Zellen. Konfrontation von Normalgewebe mit Tumorzellen in Monolayer- und Multizell-sphäroid-Kultur. Verlag Stöffler & Schütz, Stuttgart, Germany. 193p.
- Bretting** H. & Kabat E.A. (1976) Purification and characterisation of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. Biochemistry, 15(15): 3228-3236.
- Brümmer** F., Nickel M. & Sidri M. (2003) Porifera (Schwämme). In: Hofrichter (ed) Das Mittelmeer. Band II/1. Bestimmungsführer. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 302-381.
- Brümmer** F., Calcinai B., Götz M., Leitermann F., Nickel M., Sidri M. & Zucht W. (2005) Overview on the sponge fauna of the Limski Kanal, Croatia, northern Adriatic sea. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova. 68: 219-227.
- Buchholz** K., Kasche V. & Bornscheuer U.T. (2005) Biocatalysts and Enzyme technology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 448p.
- Busch** D.W.H., Dieffenbach J.F., Hecker J.F.C., Horn E., Jüngken J.C., Link H.F., Müller J. (1844) Encyclopädisches Wörterbuch der medicinischen Wissenschaften. Hrsg. Verlag Veit *et* Comp., Berlin.
- Camacho** F.G., Chileh T., Garcia M.C.C., Miron A.S., Belarbi E.H., Gomez A.C. & Grima E.M. (2006a) Sustained growth of explants from Mediterranean sponge *Crambe crambe* cultured *in vitro* with enriched RPMI 1640. Biotechnol. Prog., 22: 781-790.
- Camacho** F.G., Chileh T., Garcia M.C.C., Miron A.S., Belarbi E.H., Chisti Y. & Grima E.M. (2006b) A bioreaction - diffusion model for growth of marine sponge explants in bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73: 525-532.
- Carballo** J.L., Naranjo S. & Garcia-Gomez J.C. (1997) Where does the Mediterranean Sea begin? Zoogeographical affinities of the littoral sponges of the straits of Gibraltar. J. Biogeogr., 24: 223-232.
- Caruso** T., Falciai L. & Zupo V. (2005) Do hermit crabs like living in sponges? *Paguristis eremita* and *Suberites domuncula*: biometric data from the southern Mediterranean Sea. J. Mar. Biol. Ass. UK, 85: 1353-1357.
- Cerrano** C., Arillo A., Bavestrello G., Calcinai B., Cattaneo-Vietti R., Penna A., Sarà M. & Totti C. (2000) Diatom invasion in the Antarctic hexactinellid sponge *Scolymastra joubini*. Polar Biol., 23: 441-444.
- Chabot** G.G., Bouchard J. & Momparler R.L. (1983) Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. Biochem. Pharmacol., 32:1327-1328.
- Chanas** B. & Pawlick J.R. (1996) Does the skeleton of a sponge provide a defence against predatory reef fish? Oecologia, 107: 225-231.

-
- Characklis** W.G. & Marshall K.C. (1990) *Biofilms. Ecological and applied microbiology*, N.Y., John Wiley & Sons.
- Cheshire** A.C. & Wilkinson C.R. (1991) Modelling the photosynthetic production by sponges on Davies Reef, Great Barrier Reef. *Mar. Biol.*, 109: 13-18.
- Cimino** G., de Rosa S., de Stefano S., Spinella A. & Sodano G. (1984) The zoochrome of the sponge *Verongia aerophoba*. *Tetrahedron Lett.*, 25(27): 2925-2928.
- Connes** R. (1977) Contribution a l'étude de la gemmulogénèse chez la Démospogée marine *Suberites domuncula*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 118(4): 391-407.
- Connes** R. (1978) Étude du développement des gemmules chez la Démospogée marine *Suberites domuncula*. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris, 12e Série, Vol. 20*: 357-387.
- Corriero** G., Sara M. & Vaccaro P. (1996) Sexual and asexual reproduction in two species of *Tethya* (Porifera: Demospongiae) from a Mediterranean coastal lagoon. *Mar. Biol.*, 126: 175-181.
- Corriero** G., Liaci L. S., Marzano, C. N. & Gaino, E. (1998) Reproductive strategies of *Mycale contarenii* (Porifera: Demospongiae). *Mar. Biol.*, 131(2): 319-327.
- Custodio** M.R., Prokic I. Steffen R., Koziol C., Borojevic R., Brümmer F., Nickel M. & Müller W.E.G. (1998) Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mechanisms of Ageing and Development*, 105: 45-59.
- Dahms** H.-U., Gao Q.-F. & Hwang J.S. (2007) Optimized maintenance and larval production of the bryozoan *Bugula neritina* (Bugulidae: Gymnolaemata) in the laboratory. *Aquaculture*, 265: 169-175.
- de Caralt** S., Agell G. & Uriz M.J. (2003) Long-term culture of sponge explants: conditions enhancing survival and growth, and assessment of bioactivity. *Biomolecular Engineer.*, 20: 339-347.
- de Caralt** S., Otjens H., Uriz M.J. & Wijffels R.H. (2007) Cultivation of sponge larvae: Settlement, survival and growth of juveniles. *Mar. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s10126-007-9013-5: 1-14.
- de Rosa** S., de Caro S., Tommonaro G., Slantchev K., Stefanov K. & Popov S. (2001) Development in a primary cell culture of the marine sponge *Ircinia muscarum* and analysis of the polar compounds. *Mar. Biotechnol.*, 3: 281-286.
- de Rosa** S., Tommonaro G., Slantchev K., Stefanov K. & Popov S. (2002) Lipophylic metabolites from the marine sponge *Ircinia muscarum* and its cell cultures. *J. Mar. Biol.*, 140: 465-470.
- de Rosa** S., de Caro S., Iodice C., Tommonaro G., Stefanov K. & Popov S. (2003) Development in primary cell culture of demosponges. *J. Biotechnol.*, 100: 119-125.
- Diaz** M.C. & Ward B.B. (1997) Sponge mediated nitrification in tropical benthic communities. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 156: 97-107.
- Diaz** M.C. & Rützler K. (2001) Sponges: an essential component of Caribbean coral reefs. *Bull. Mar. Sci.*, 69(2): 535-546.
- Duarte** C., Goncales J. & Humanes M. (2002) Bioassay guided fractionation of the crude extract of a marine sponge: HIV-I inhibition. In: *Book of Abstracts, 6th Internat. Sponge Conference, Rapallo, Italy, 2002*: 57p.

-
- Duckworth** A.R., Battershill C.N. & Bergquist P.R. (1997) Influence of explants procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture*, 156: 251-267.
- Duckworth** A.R., Battershill C.N., Schiel D.R. & Bergquist P.R. (1999) Farming sponges for the production of bioactive metabolites. *Mem. Queensl. Mus.*, 44: 155-159.
- Duckworth** A.R. & Battershill C.N. (2001) Population dynamics and chemical ecology of New Zealand Demospongiae *Latrunculia* sp. nov. and *Polymastia croceus* (Poecilosclerida, Latrunculiidae: Polymastiidae). *New Zealand J Mar. & Freshwater Res.*, 35(5): 935-945.
- Duckworth** A.R. & Battershill C.N. (2003a) Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. *Aquaculture*, 221: 311-329.
- Duckworth** A.R. & Battershill C.N. (2003b) Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture*, 217: 139-156.
- Duckworth** A.R., Samples G.A., Wright A.E. & Pomponi S. (2003) *In vitro* culture of the tropical sponge *Axinella corrugata* (Demospongiae): Effect of food cell concentration on growth, clearance rate, and biosynthesis of Stevensine. *Mar. Biotechnol.*, 5: 519-527.
- Dumdei** E.J., Blunt J.W., Munro M.H.G, Battershill C.N. & Page (1998) The whys and what's of sponge chemistry: Why chemistry extract sponges and what problems does this cause? In: Watanabe & Fusetani (ed) *Sponge science: Multidisciplinary perspectives*. Tokyo, Springer-Verlag: 353-365.
- Ebel** R., Brenzinger M., Kunze A., Gross H.J. & Proksch P. (1997) Wound activation of Pro-toxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, 23(5): 1451-1462.
- Elvin** D.W. (1976) Seasonal growth and reproduction of an intertidal sponge, *Haliclona permollis* (Bowerbank). *Biol. Bull.*, 151: 108-125.
- Engel** S. & Pawlick J.R. (2005) Interactions among Florida sponges. I. Reef habitats. Vol. 303: 133-144. II. Mangrove habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 303: 145-152.
- Esper** E.J.C. (1794) *Die Pflanzenthiere in Abbildungen nach der Natur mit Farben erleuchtet nebst Beschreibungen*. Raspesche Buchhandlung, Nürnberg.
- Faber** K. (2004) *Biotransformation in organic chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, New York, London, Tokyo: 454p.
- Faulkner** D.J. (2000a) Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.*, 17: 1-6.
- Faulkner** D.J. (2000b) Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77: 135-145.
- Faulkner** D.J. (2002) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 1-48.
- Fell** P.E. (1974) Diapause in the gemmules of the marine sponge *Haliclona loosanoffi*, with a note on the gemmules of *Haliclona oculata*. *Biol. Bull.*, 147: 333-351.
- Fell** P.E. (1975) Salinity tolerance and desiccation resistance of the gemmules of the brackish-water sponge *Haliclona loosanoffi*. *J. Exp. Zool.*, 194: 409-412.
- Fell** P.E. (1987) Influences of temperature and desiccation on the breaking of diapause in the gemmules of *Eunapius fragilis* (Leidy). *Int. J. Invertebr. Reprod. Develop.*, 18: 213-219.
- Fell** P.E. (1989) Environmental factors affecting dormancy in the freshwater sponge *Eunapius fragilis* (Leidy). *Invertebrate Reproduction & Development*. Rehovot, 18(3): 213-219.

-
- Fell P.E.** (1992) Salinity tolerance of the gemmules of *Eunapius fragilis* (Leidy) and the inhibition of germination by various salts. *Hydrobiologia*, 242: 33-39.
- Fell P.E.** (1995) Deep diapause and the influence of low temperature on the hatching of the gemmules of *Spongilla lacustris* (L.) and *Eunapius fragilis* (Leidy). *Invertebr. Biol.*, 114: 3-8.
- Fieseler L.**, Hentschel U., Grozdanov L., Schirmer A., Wen G., Platzer M., Hrvatin S., Butzke D., Zimmermann K. & Piel J. (2007) Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Appl. & Environm. Microbiol.*, 73(7): 2144-2155.
- Francis J.C.**, Poirrier M.A. & LaBiche R.A. (1982) Effects of calcium and salinity on the growth rate of *Ephydatia fluviatilis* (Porifera: Spongillidae). *Hydrobiologia*, 89: 225-229.
- Freshney I.** (2000) Culture of animal cells. Wiley-Liss. Inc, N.Y., USA.
- Friedrich A.B.**, Merkert H., Fendert T., Hacker J. Proksch P. & Hentschel U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Mar. Biol.*, 134: 461-470.
- Friedrich A.B.**, Fischer I., Proksch P., Hacker J. & Hentschel U. (2001) Temporal variations of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbial. Ecol.*, 1301: 1-9.
- Fusetani N.** (2004) Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 94-104.
- Gaino E.**, Bavestrello G. & Magnino G. (1999) Self / non-self recognition in sponges. *Ital. J. Zool.*, 66: 299-315.
- Gaino E.**, Reborá M., Corallini C. & Lancioni T. (2003) The life-cycle of the sponge *Ephydatia fluviatilis* (L.) living on the reed *Phragmites australis* in an artificial regulated lake. *Hydrobiologia*, 495: 127-142.
- Garrone R.** (1978) Phylogenesis of connective tissue. Karger Verlag, Basel.
- Gatti S.** (2002) The role of sponges in high-Antarctic carbon and silicon cycling: a modelling approach. *Ber. Polarforsch. Meeresforsch.*: 105p.
- Gatti S.** & Brey T. (2002) Methusalem im Meer. *Bild der Wissenschaft*, 11: 10.
- Gatti S.**, Brey T., Müller W.E.G., Heilmayer O. & Holst N. (2002) Oxygen microoptodes: A new tool for oxygen measurements in aquatic animal ecology. *Mar. Biol.*, 140: 1075-1085.
- Goslar M.** (2007) Adaptierung eines 3-D-Laserscanning-Systems für 3-D-Oberflächenscans in Wasser. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Grabley S.** & Thiericke R (1999) Bioactive agents from natural sources: In: Scheper (ed) Trends in discovery and application. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, Springer Verlag: 64p.
- Gratzner H.G.** (1982) Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474.
- Grebenjuk V.A.**, Kuusksalu A., Kelve M., Schütze J., Schröder H. C. & Müller W. E. G. (2002) Induction of (2'-5')oligoadenylate synthetase in the marine sponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium* by the bacterial endotoxins lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 269: 1382-1392.

-
- Gruner H.-E.** (1993) Wirbellose Tiere. Teil 1: Einführung - Protozoa, Placozoa, Porifera. 5. Aufl. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, New York.
- Guillard R.R.L. & Ryther J.H.** (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- Guillard R.R.L.** (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith & Chanley (ed) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA: 26-60.
- Hale K.J., Hummersone M.G., Manaviazar S. & Frigero M.** (2002) The chemistry and biology of the bryostatin antitumor macrolides. Nat. Prod. Rep., 19: 413-453.
- Harsha R.E., Francis J.C. & Poirrier M.A.** (1983) Water temperature: A factor in the seasonality of two freshwater sponge species, *Ephydatia fluviatilis* and *Spongilla alba*. Hydrobiologia, 102: 145-150.
- Hart J.B., Lill R.E., Hickford S.J.H., Blunt J.W. & Munro M.H.G.** (2000) The Halichondrins: Chemistry, biology, supply and delivery. In: Fusetani (ed) Drugs from the sea. Karger, Basel: 134-153.
- Hartmann W.D.** (1983) Porifera. In: Parker (Hrsg.) Synopsis and classification of living organisms. McGraw-Hill, New York: 641-666.
- Hartmeier W.** (1986) Immobilisierte Biokatalysatoren. Eine Einführung. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 206p.
- Hatcher A.** (1994) Nitrogen and phosphorous turnover in some benthic marine invertebrates: implications for the use of C : N ratios to assess food quality. Mar. Biol., 121: 161-166.
- Hausmann R., Vitello M., Leitermann F. & Syldatk Ch.** (2006) Advances in the production of sponge biomass *Aplysina aerophoba* - A model sponge for *ex-situ* sponge biomass production. J. Biotechnol., 124: 117-127.
- Hentschel U., Fieseler L., Wehrl M., Gernert C., Steinert M., Hacker J. & Horn M.** (2003) Microbial diversity of marine sponges. In: Müller (ed) Marine molecular biotechnology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 59-88.
- Hentschel U., Usher K.M., Taylor M.W.** (2006) Marine sponges as microbial fermenters. FEMS, Microbiol. Ecol., 55: 167-177.
- Herlant-Mewis H.** (1948) La gemmulation chez *Suberites domuncula* (Olivi) Nardo. 37(4): 289-322.
- Hirata Y. & Uemura D.** (1986) Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. Pure & Appl. Chem., 58(5): 701-710.
- Hoffmann F., Larsen O., Rapp H.T. & Osinga R.** (2005) Oxygen dynamics in choanosomal sponge explants. Mar. Biol. Res., 1: 160-163.
- Hooper N.A.** (1997) Sponge guide. Guide to sponge collection and identification. Queensland Museum.
- Hooper N.A. & van Soest R.W.M.** (2002) Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. Published in two volumes: Vol. 1: Introductions and Demospongiae; Vol. 2: Calcarea, Hexactinellida, Sphinctozoa, Archaeocyatha, unrecognizable taxa, and index of higher taxa. Kluwer Academic Plenum Publishers N. Y., New York, USA.
- Hübner H.** (1998) Immobilisierung von Insektenzellen zur Optimierung der Produktbildung und -gewinnung. Dissertation, Technische Universität, Berlin.

-
- Hummel H.**, Sepers A.B.J., de Wolf L. & Melissen F.W. (1988) Bacterial growth on the marine sponge *Halichondria panicea* induced by reduced water flow rate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 42: 195-198.
- Humphreys T.** (1962) The mechanism of sponge cell adhesion. Thesis, University of Chicago.
- Ilan M.** & Abelson A. (1995) The life of a sponge in a sandy lagoon. *Biol. Bull.*, 189: 363-369.
- Ilan M.**, Contini H., Carmeli S. & Rinkevich R. (1996) Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. *J. Mar. Biotechnol.*, 4: 145-149.
- Ilan M.**, Contini H., Carmeli S. & Rinkevich R. (1998) Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing. Dev.*, 100: 107-120.
- Imhoff J.F.** & Stöhr R. (2003) Sponge-associated bacteria: General overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. In: Müller (ed) *Marine molecular biotechnology of sponges (Porifera)*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg: 35-57.
- Jetton T.L.**, Fell P.E. & Harrison F.W. (1987) Cytological and cytochemical investigations of development from dormant gemmules of the marine sponge *Haliclona loosanoffi*. *J. Morphology*, 193: 99-116.
- Kaerberlein T.**, Lewis K. & Epstein S.S. (2002) Isolating „uncultivable“ microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296: 112-1128.
- Kilian E.F.** (1952) Wasserströmung und Nahrungsaufnahme beim Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis*. *Z. Vergl. Physiol.*, 34: 407-447.
- Kinne O.** (1977) Cultivation of animals. *Marine Ecology - A comprehensive, integrated treatise on life in ocean and coastal waters*. Vol. III (Part 2). Wiley & Sons.
- Kikuchi A.**, Nieda M., Schmidt C., Koezuka Y., Ishihara S., Ishikawa Y., Tadokoro K., Durrant S., Boyd A., Juji T. & Nicol A. (2001) *In-vitro* antitumor activity of alpha-galactosylceramide-stimulate human invariant V alpha 24+NKT cells against melanoma. *Br. J. Cancer*, 85: 741-746.
- Klautau M.**, Custodio M. R. & Borojevic R. (1994) *In vitro* culture of primary cell lines from marine sponges. In: van Soest, van Kempen & Braekman. (ed) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam: 401-406.
- Klemt M.** (2004) Identifizierung eines adaptiven antibakteriellen Abwehrmechanismus des marinen Schwammes *Suberites domuncula*. Dissertation, Universität Mainz.
- Kobayashi M.** (2000) Search for biological active substances from marine sponges. *Drugs from the sea*. In: Fusetani (ed). Basel, Krager: 46-58.
- Koziol C.** Borojevic R., Steffen R. & Müller W.E.G. (1998) Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing Dev.*, 100: 107-120.
- Krasko A.**, Batel R., Schröder H.C., Müller I.M. & Müller W.E.G. (2000) Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Eur. J. Biochem.*, 267: 4878-4887.
- Krasko A.**, Schröder H.C., Batel R., Grebenjuck V.A., Steffen R., Müller I.M. & Müller W.E.G. (2002) Iron induced proliferation and morphogenesis in primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*. *DNA Cell Biol.*, 21: 67-80.

-
- Kühnle M.C.** (2003) *In vitro*-Kultivierung von Primmorphen der Schwämme *Axinella polypoides* und *Aplysina aerophoba*. Studienarbeit, Universität Stuttgart.
- Lambert W.T. & Burke S.T.** (2002) Halichondrin B: Synthesis of a C1-C14 model via desymmetrization of (+)-Conduritol E. *Organic Letters*, 5 (4): 515-518.
- Langenbruch P.-F.** (2004) Zur Entstehung der Gemmulae bei *Ephydatia fluviatilis* (L.) (Porifera). *Zoomorphology*, 97(3): 263-284.
- Larsen P.S., Matlok S.S. & Riisgård H.U.** (1998) Bryozoan filter feeding in laminar wall layers: Flume experiments and computer simulation. *Vie Milieu*, 48(4): 309-319.
- Lee Y. K., Lee J.-H. & Lee H.K.** (2001) Microbial symbiosis in marine sponges, *J. Microbiol.*, 39(4): 254 - 264.
- Leininger S.** (2000) Reaggregate mediterraner Schwämme (Porifera) *in-vitro*: Vorarbeiten zur Produktion von Biomasse zur Gewinnung von bioaktiven Stoffen. Studienarbeit, Universität Stuttgart.
- Le Pennec G., Perovic S., Ammar M.S.A., Grebenjuk V.A., Steffen R., Brümmer F. & Müller W.E.G.** (2002) Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron - A review. *J. Biotechnol.*: 1-16.
- Le Pennec G., Perovic S., Ammar M.S.A., Grebenjuk V.A., Steffen R. & Müller W.E.G.** (2003) Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron. *J. Biotechnol.*, 100: 93-108.
- Li C.W., Chen J.Y. & Hua T.E.** (1998) Precambrian sponges with cellular structures. *Sciences*, 279: 879-882.
- Liaan-Jensen S.** (1991) Marine carotenoids. Recent progress. *Pure Appl. Chem.*, 63: 1-12.
- Litaudon M., Hart J.B., Blunt J.W., Lake R.J. & Munro, M.H.G.** (1994) Isohomohalichondrin B: a new antitumor polyether macrolide from the New Zealand deep-water sponge *Lissodendoryx* sp. *Tetrahedron Lett.*, 35: 9435 - 9438.
- Lombardi Ch., Cocito S., Occhipinti-Ambrogi A. & Hiscock K.** (2006) The influence of seawater temperature on zooid size and growth rate in *Pentapora fascialis* (Bryozoa: Cheilostomata). *Mar. Biol.*, 149: 1103-1109.
- Loomis S.H., Ungemach L.F., Branchini B.R., Hand S.C. & Fell P.E.** (1996) Carbohydrate mobilization during germination of post-diapausing gemmules of the freshwater sponge *Eunapius fragilis*. *Biol. Bull.*, 191: 393-401.
- Lukanoff B. & Dautzenberg H.** (1994) Natriumcellulosesulfat als Komponente für die Erzeugung von Mikrokapseln durch Polyelektrolytkomplexbildung. *Das Papier*, 6: 287-298.
- Maldonado M. & Young C.M.** (1998) Limits on the bathymetric distribution of keratose sponges. A field test in deep water. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 174: 123-139.
- McKee T.C., Cardellina J.H., Riccio R., Dauria M.V., Iorizzi M., Minale L., Moran R.A., Gulakowski R.J., McMahon J.B., Buckheit R.B., Snader R.M. & Boyd M.R.** (1994) Hiv-inhibitory natural products. 11. Comparative studies of sulphated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem.*, 37: 793-797.
- Mendola D.** (2000) Aquacultural production of Bryostatin 1 and Ecteinascidin 743. In: Fusetani (ed) *Drugs from the sea*. Krager-Verlag, Basel: 120-133.

-
- Mendola D.** (2003) Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomolecul. Engineer.*, 20(4-6): 441-458.
- Mendola D.**, Naranjo Lozano S.A., Duckworth A.R., Osinga R. (2006) The promise of aquaculture for delivering sustainable supplies of new drugs from the sea: examples from in-sea and tank-based invertebrate culture projects from around the world. In: Proksch & Müller (ed) *Frontiers in marine biotechnology*. Horizon, Norfolk: 21-72.
- Messal C.** (2005) Habitatcharakterisierung des Limski-Kanals für mediterrane Schwämme (Porifera). Diplomarbeit, Universität Freiberg (TU).
- Milanese M.**, Chelossi E., Manconi R., Sará A., Sidri M. & Pronzato R. (2003) The marine sponge *Chondrilla nucula* (Schmidt, 1862) as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. *Biomolecular Engineer.*, 20: 363-368.
- Minale L.**, Riccio R., Sodano G. (1974) Avarol, a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *Dysidea avara*. *Tetrahedron Lett.*, 15(38) : 3401 - 3404
- Mizoguchi H.** & Watanabe Y. (1994) Effect of 5-bromodeoxyuridine and aminopterin on cell proliferation and morphogenesis after gemmule hatching of the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. In: van Soest, van Kempen & Braekman (ed) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam: 377-383.
- Möhn E.** (1984) System und Phylogenie der Lebewesen. Schweitzbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Mrutzek M.** & Kokott J. (2004) Nitrat - und Phosphatprobleme ade? Praxistest zur "Wodkamethode". *Der Meerwasseraquarianer*, 1/2004: online erhältlich. Latka-Verlag.
- Müller K.** (1911) Reduktionserscheinungen bei Süßwasserschwämmen. *Arch. Entwicklunsm.*, 32: 557-607.
- Müller W.E.G.** (2001) How was the metazoan threshold crossed? The hypothetical urmetazoa. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 129(2-3): 433-460.
- Müller W.E.G.** (2003) Sponges (Porifera). Müller (ed) *Marine molecular biotechnology. Subseries of progress in molecular and subcellular biology (PMSB)*: 258p.
- Müller W.E.G.**, Zahn R.K., Bittlingmeier K. & Falke D. (1977a) Inhibition of herpesvirus DNA-synthesis by 9-β-D-arabinofuranosyladenosine *in-vitro* and *in-vivo*. *Ann. New York. Acad. Sci.*, 284: 34p.
- Müller W.E.G.**, Zahn R.K., Beyer R. & Falke D. (1977b) 9-β-D-Arabinofuranosyladenine as a tool to study herpes simplex virus DNA replication *in-vitro*. *Virology*, 76: 787p.
- Müller W.E.G.**, Müller I. & Zahn R.K. (1978) Aggregation in sponges. Regulation of programmed synthesis by cell membrane changes. *Res. Mol. Biol.*, 8: 86p.
- Müller W.E.G.**, Zahn R.K., Kurelec B., Lucu C., Müller I. & Uhlenbruck G. (1981) Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *J. Bacteriology*, 145(1): 548-558.
- Müller W.E.G.**, Dorn A. & Uhlenbrock G. (1985) The molecular mechanism of the distinct calcium-dependent aggregation system in marine sponges and corals. *Acta Histochemica, Suppl. Band XXXI*: 37-46.

-
- Müller** W.E.G., Sobel C., Diehl-Seifert B., Maidhof A. & Schröder H.C. (1987a) Influence of the antileukemic and anti-human immunodeficiency virus agent avarol on selected immune responses *in-vitro* and *in-vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, 36 (9): 1489-1494.
- Müller** W.E.G., Sladic D., Zahn R.K., Bassler K.H., Dogovic N., Gerner H., Gasic M.J., & Schröder H.C. (1987b) Avarol-induced DNA strand breakage *in-vitro* and in friend erythroleukemia cells. *Cancer Res.*, 47 (24, Part 1): 6565-6571.
- Müller** W.E.G., Wiens M., Batel R., Steffen R., Schröder H.C., Borojevic R. & Custodio M.R. (1999) Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 178: 205-219.
- Müller** W.E.G. & Custodio M.R. (2000) Primary cell culture from a sponge: Primmorphs. In: Mothershill & Austin (ed) *Aquatic invertebrate cell culture*. Praxis Publishing, Springer: 205-224.
- Müller** W.E.G., Wiens M., Müller I.M. & Brümmer F. (2004a) From cells to primmorphs and adult sponges: An approach to understand the bauplan of Demospongiae. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova*, 68: 39-54.
- Müller** W.E.G., Thakur N.L., Ushijima H., Thakur A. N., Krasko A., Le Penne G., Indap M.M., Perovic-Ottstadt S., Schröder H. C., Lang G. & Bringmann G. (2004b) Matrix mediated canal formation in primmorphs from the sponge *Suberites domuncula* involves the expression of a CD36 receptor-ligand system. *J. Cell. Sci.*, 117: 2579-2590.
- Müller** W.E.G., Grebenjuk V. A., Le Penne G., Schröder H. C., Brümmer F., Hentschel U., Müller I. M. & Breter, H. J. (2004c) Sustainable production of bioactive compounds by sponges - Cell culture and gene cluster approach: A review. *Mar. Biotechnol.*, 6(2): 105-117.
- Müller-Klieser** W. (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am. J. Physiol.*, 273, C1109-C1123.
- Munro** M.H.G., Blunt J.W., Lake R.J. & Litaudon M. (1994) From seabed to sickbed: What are the prospects? In: van Soest, van Kempen & Braekman (ed) *Sponges in Time and Space*. Balkema, Rotterdam: 473-484.
- Munro** M.H.G., Blunt J.W., Dumdei E.J., Hickford S.J.H., Lill R.E., Shangxiao L., Battershill C.N. & Duckworth A.R. (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.*, 79: 15-25.
- Nickel** M. (2001) Cell biology and biotechnology of marine invertebrates. Sponges (Porifera) as model organisms. Dissertation, Universität Stuttgart. ISSN 0723-2055, Nr.32.
- Nickel** M., Proll G. & Brümmer F. (2000) Natural Products of marine sponges - from ecology to biomass. Proc. 4th Int. Congress on Biochem. Engineer., Stuttgart, Germany.
- Nickel** M., Leininger S., Proll G. & Brümmer F. (2001) Comparative studies on two potential methods for the biotechnological production of sponge biomass. *J. Biotechnol.*, 92: 169-178.
- Nickel** M. & Brümmer F. (2003) *In-vitro* sponge fragment culture of *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847). *J. Biotechnol.*, 100: 147-159.
- Nickel** M., Sidri M., Küttner A., Knopp A. & Brümmer F. (2004) Non-invasive biometric studies on *Suberites domuncula* by multidetector X-ray computed tomography. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova*, 68: 491-497.
- Olivi** G. (1792) *Zoologia Adriatica*, Reale Accademia di Scienze Lettere ed Arti, Bassano: 334.

-
- Osinga R.**, Planas-Muela E., Tramper J. & Wijffels R.H. (1997) *In vitro* cultivation of four marine sponge species. Determination of the nutritional demands. In: Le Gal, Muller-Feuga (ed) Marine micro organisms for industry. Ifremer: 121-127.
- Osinga R.**, Tramper J. & Wijffels R. H. (1998) Cultivation of marine sponges for metabolite production: Application for biotechnology? Trends in Biotechnology, 16: 130-134.
- Osinga R.**, Tramper J. & Wijffels R.H. (1999a) Cultivation of marine sponges. Mar. Biotechnol., 1: 509-532.
- Osinga R.**, de Beukelaer P.B., Meijer E.M., Tramper J. & Wijffels R.H. (1999b) Growth of the sponge *Pseudosuberites* (aff.) in a closed system. Mar. Biotechnol., 70: 155-161.
- Osinga R.**, Redeker D., de Beukelaer P.B. & Wijffels R.H. (1999c) Measurement of sponge growth by projected body area and underwater weight. Mem. Queensl. Mus., 44: 419-426.
- Osinga R.**, Tramper H., Wijffels R. H. & Pomponi S.A. (2000) Sponge Biotechnology: Three potential solutions to the "supply problem". IMBC 2000, Townsville: 136p.
- Osinga R.**, Kleijn R., Groenendijk E., Niesink P., Tramper J. & Wijffels R. H. (2001) Development of *in-vivo* sponge cultures: Particle feeding by the tropical sponge *Pseudosuberites* (aff.) *andrewsii*. Mar. Biotechnol., 3: 544-554.
- Osinga R.**, Belarbi E.H., Grima E.N., Tramper J. & Wijffels R.H. (2003) Progress towards a controlled culture of the marine sponge *Pseudosuberites andrewsii* in a bioreactor. J. Biotechnol., 100: 141-146.
- Orive G.**, Hernández R.M., Gascón A.R., Igartua M. & Pedraz J.L. (2003) Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. Int. J. Pharmaceutics, 259: 57-68.
- Paul J.** (1970a): Sedimentgeologische Untersuchungen eines küstennahen mediterranen Schlamm-bodens (Limski Kanal, nördliche Adria). Geologische Rundschau, 60: 205-222.
- Paul J.** (1970b): Sedimentologische Untersuchungen im Limski Kanal und vor der istrischen Küste (nördliche Adria). Göttinger Arbeiten zur Geologie und Paläontologie, 7: 1-75.
- Penney J.T.** (1954) Ecological observations on the freshwater sponges of the Savannah River Operations Area. University of South Carolina Pub. Serv. III, Biology, 1 (3): 156-172.
- Piel J.**, Hui D., Wen G., Butzke D., Platzer M., Fusetani N. & Matsunaga S. (2004) Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. PNAS, 101(46): 16222-16227.
- Pile A.J.**, Patterson M.R. & Witman J.D. (1996) *In-situ* grazing on plankton >10µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 141: 95-102.
- Pile A.J.** (1997) Finding Reising's missing carbon: Quantification of sponge feeding using dual-beam flow cytometry. Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.: 1403-1410.
- Pomponi S.A.** & Willoughby R. (1994) Sponge cell culture for production of bioactive metabolites. In: van Soest, van Kempen & Braekman (ed) Sponges in Time and space. Balkema, Rotterdam: 395-400.
- Pomponi S.A.** (2006) Biology of the Porifera: cell culture. Can. J. Zool. - Revue Canadienne de Zoologie, 84(2): 167-174.

-
- Poirrier** M.A., Francis J.C. & LaBiche R.A. (1981) A continuous-flow system for growing fresh-water sponges in the laboratory. *Hydrobiologia*, 79: 255-259.
- Proksch** P., Edrada R.A. & Ebel R. (2002) Drugs from the seas: Current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 125-134.
- Proksch** P., Edrada-Ebel R. & Ebel R. (2006) *Apotheke am Meeresgrund. Biologie unserer Zeit.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 36: 150-159.
- Pronzato** R., Bavestrello G., Cerrano C., Magnino G., Manconi R., Pantelis J., Sará A. & Sidri M. (1999) Sponge farming in the Mediterranean Sea: new perspectives. *Mem. Queensl. Mus.*, 44: 485-491.
- Pronzato** R. & Manconi R. (2001) Atlas of European freshwater sponges. *Ann. Mus. Civ. St. Na. Ferrara*, 4: 3-64.
- Rasmont** R. (1954) La diapause chez le Spongillides. *Bull. Acad. Roy. Belgium Sci.*, 40: 288-304.
- Rasmont** R. (1970) Some new aspects of the physiology of fresh-water sponges. *Symp. Zool. Soc. London*, 25: 415-442.
- Redfield** A.C., Ketchum B.H. & Richard F.A. (1963) The influence of organisms on the composition of seawater. In: Hill (ed) *The Sea*. Wiley, New York: 26-77.
- Reiswig** K. (1971) Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol. Bull.*, 141: 568-591.
- Reiswig** K. (1973) Population dynamics of three Jamaican Demospongiae. *Bull. Mar. Sci.*, 23: 191-226.
- Reiswig** K. (1975a) Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Can. J. Zool.*, 53: 582-589.
- Reiswig** K. (1975b) The aquiferous systems of three marine Demospongiae. *J. Morph.*, 145: 493-502.
- Ribes** M., Coma R. & Gili J.-M. (1999a) Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 176: 179-190.
- Ribes** M., Coma R. & Gili J.-M. (1999b) Seasonal variation of particulate organic carbon, dissolved organic carbon and the contribution of microbial communities to the live particulate organic carbon in a shallow near-bottom ecosystem at the northwestern Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, 21: 1077-1100.
- Riisgård** H.U., Thomassen S., Jakobsen H., Weeks J.M. & Larsen P.S. (1993) Suspension feeding in marine sponges *Halichondria panicea* and *H. urceolus* - effects of temperature on filtration rate and energy-cost of pumping. *Mar. Ecol.*, 96(2): 177-188.
- Rinkevich** B. & Blisto R. (1998) Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies. Letters to the editor. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal*, 34: 753-756.
- Rinkevich** B. (1999) Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.*, 70: 133-153.
- Rothenberger** M. (2005) Funktionelle und morphologische Untersuchungen der Silikataufnahme und Nadelbildung im marinen Schwamm *Suberites domuncula*. Dissertation, Universität Mainz.

-
- Rühle S.**, Gerçe B., Voigt M., Syldatk Ch. & Hausmann R. (übermittelt) Energetics of the sponge *Aplysina aerophoba* under artificial cultivation conditions. Mar. Biotechnol.
- Sará M.** (1971) Ultrastructural aspects of symbiosis between two species of genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae). Mar. Biol., 11(3): 214.
- Sarma A.S.** (2004) Marine sponge metabolites: Avarol, Avarone and congeners - biological properties and synthetic studies. Vortrag im Institut für physiologische Chemie der Universität Mainz vom 30.04.2004.
- Sarin P.S.**, Sun D., Thornton A., Müller W.E.G. (1987) Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus / lymphadenopathy-associated virus) by Avarol and Avarone. J. Nat. Canc. Inst., 78: 663-666.
- Schill R.O.**, Pfannkuchen M., Fritz G., Köhler H.-R. & Brümmer F. (2006) Quiescent gemmules of the freshwater sponge *Spongilla lacustris* (L., 1759), contain remarkably high levels of Hsp70 stress protein and *hsp70* stress gene mRNA. J. Exp. Zool., 305A: 449-457.
- Schmahl G.P.** (1991) Community structure and ecology of sponges associated with four southern Florida coral reefs. In: Rützler (ed) New perspectives in sponge biology. Smithsonian Inst. Press, Washington DC, USA: 376-383.
- Schmidt O.** (1862) Die Spongien des Adriatischen Meeres. Verlag von W. Engelmann: 1-86.
- Schmitz F.J.** (1994) Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. In: van Soest, van Kempen & Braekman (ed) Sponges in Time and Space. Balkema, Rotterdam: 485-496.
- Schröder D.**, Brümmer F., Fattorusso E., Aiello A., Menna M., de Rosa S., Batel R. & Müller W.E.G. (2003) Sustainable production of bioactive compounds from sponges: Primmorphs as bioreactors. In: Müller (ed) Sponges. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 163-197.
- Sepers A.B.J.** (1977) The utilization of dissolved organic compounds in aquatic environments. Hydrobiologia, 52 (1): 39-54.
- Sharp J.H.**, Winson M.K. & Porter J. (2007) Bryozoan metabolites: an ecological perspective. Nat. Prod. Rep., 24: 659-673.
- Sidri M.** (2004) *Chondrilla nucula* (Porifera: Demospongiae): An example of successful plasticity. Ecological and morphological aspects. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Sidri M.**, Brümmer F., Milanese M., Nickel M. & Zucht W. (2004) Morphological plasticity, locomotion and epibiosis in the Mediterranean sponge *Chondrilla nucula* (Schmidt, 1862) (Porifera, Demospongiae): an overview. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova, 68: 219-227.
- Simpson T.L.** (1984) The cell biology of sponges. Springer Verlag, New York. 662p.
- Sipkema D.**, Heilig H.G.H.J., Akkermans A.D.L., Osinga R., Tramper J. & Wijffels R.H. (2003a) Sponge-cell culture? A molecular identification method for sponge cells. Mar. Biotechnol., 5 (5): 443-449.
- Sipkema D.**, Wielink R. van, Lammeren A.A.M., Tramper J., Osinga R. & Wijffels R.H. (2003b) Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. J. Biotechnol., 100: 127-139.
- Sipkema D.**, Snijders A.P.L., Schroën C.G.P.H., Osinga R. & Wijffels R.H. (2004) The life and death of sponge cells. Biotechnol. & Bioengin., 85(3): 239-247.

-
- Sipkema D.**, Osinga R., Schatton W., Mendola D., Tramper J. & Wijffels R.H. (2005a) Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: Sea, cell, or synthesis? *Biotechnol. & Bioengineer.*, 90(2): 201-222.
- Sipkema D.**, Franssen M.C.R., Osinga R., Tramper J. & Wijffels R.H. (2005b) Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7: 142-162.
- Sipkema D.**, Yosef N.A.M., Adamczewski M., Osinga R., Mendola D., Tramper J. & Wijffels R.H. (2006) Hypothesized kinetic models for describing the growth of globular and encrusting Demosponges. *Mar. Biotechnol.*, 8: 40-51.
- Sommer U.** (1998) *Biologische Meereskunde*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 472 p.
- Southward A.J.** & Southward E.C. (1970) Observations on role of dissolved organic compounds in nutrition of benthic invertebrates - experiments on three species of Pogonophora. *Sarsia*, 45: 69p.
- Southward A.J.** & Southward E.C. (1972) Observations on role of dissolved compounds in nutrition of benthic invertebrates. 3. Uptake in relation to organic content of habitat. *Sarsia*, 50: 29p.
- Spiekermann P.**, Vorlop K.D. & Klein J. (1987) Animal cells encapsulated within Ca-Alginate hollow-spheres. In: Neijssel, van der Meer & Luyben (ed) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 590-593.
- Steffens S.** (2003) Prokaryoten und mikrobielle Eukaryoten aus marine Schwämmen. Ökologische, morphologische und molekularbiologische Untersuchungen. Dissertation, Universität Bonn.
- Stephens G.C.** (1968) Dissolved organic matter as a potential source of nutritions for marine organisms. *Amer. Zool.*, 8(1): 95p.
- Stierle A.C.**, Cardellina J.H. & Singleton F.L. (1988) A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia*, 44(11-12): 1021.
- Strekal T.A.** & McDiffett W.F. (1974) Factors affecting germination, growth and distribution of the freshwater sponge *Spongilla fragilis*, Leidy (Porifera). *Biol. Bull.*, 146: 267-278.
- Taylor M.W.**, Radax R., Steger D. & Wagner M. (2007) Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. & Molecular Biol. Reviews*, 71(2): 295-347.
- Thakur N.L.**, Hentschel U., Krasko A, Pabel C.T., Anil A.N. & Müller W.E.G. (2003) Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for the defence. *Aquat. Microbial Ecol.*, 31: 77-83.
- Thakur N.L.** & Müller W.E.G. (2004) Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, 86(11): 1506-1512.
- Thoms C.**, Horn M., Wagner M., Hentschel U. & Proksch P. (2003) Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar. Biol.*, 142: 685-692.
- Thoms C.** (2004) Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina* - chemische Ökologie und assoziierte Bakterien. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Toledo G.**, Green W., Gonzolez R.A., Christoffersen L., Poda M., Chang H.W., Hemscheidt Th., Trapido-Rosenthal H.G., Short J.M., Bidigare R.R. & Mathur E. (2006) High throughput cultivation for isolation of novel marine microorganisms. *Oceanography*, 19 (2): 100-105.

-
- Turon X.**, Tarjuelo I. & Uriz M.J. (1998) Growth dynamics and mortality of the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) in contrasting habitats: correlation with population structure and investment in defence. *Funct. Ecol.*, 12: 631-639.
- Turon X.**, Becerro M.A. & Uriz M.J. (2000) Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell and Tissue Research*, 301: 311-322.
- Unson M.D.** & Faulkner J.D. (1993) Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbecea* (Porifera). *Experientia*, 49: 349-353.
- Vacelet J.** & Donadey C. (1977) Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30: 301-314.
- Vacelet J.** & Duport E. (2004) Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera : Demospongiae). *Zoomorphol.*, 123(4): 179-190.
- Valisano L.**, Bavestrello G., Giovine M. & Cerrano C. (2006a) Primmorph formation dynamics: a screening among Mediterranean sponges. *Mar. Biol.*, 149: 1037-1046.
- Valisano L.**, Bavestrello G., Giovine M. & Cerrano C. (2006b) Effect of iron and dissolved silica on primmorphs of *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789). *Chemistry & Ecology*, 23(3): 233-241.
- van de Vyver G.**, Vray B., Belauane S. & Toussaint D. (1990) Efficiency and selectivity of microorganism retention by *Ephydatia fluviatilis*. In: Rützler, MacIntyre & Smith (ed) *New perspectives in sponge biology*. Smithsonian Inst. Press, Washington DC: 511-515.
- van Soest R.W.M.** (1996) Porifera, Schwämme. In: Westheide & Rieger (ed) *Spezielle Zoologie*. Erster Teil: Einzeller und wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, New York.
- van Soest R.W.M.**, Picton B. & Morrow C. (2000) Sponges of the Northeast Atlantic. World biodiversity database CD-ROM series. Springer Verlag, Heidelberg.
- van Treeck P.**, Eisinger M., Müller J., Paster M. & Schuhmacher H. (2003) Mariculture trials with Mediterranean sponge species - The exploitation of an old natural resource with sustainable and novel methods. *Aquaculture*, 218: 439-455.
- Vitello M.** (2004) Biotechnologische Kultivierung mariner Schwämme am Beispiel *Aplysina aerophoba*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- Vogel S.** & Bretz W.L. (1971) Interfacial organism: passive ventilation in the velocity gradients near surface. *Science*, 175: 210-211.
- Wang G.** (2006) Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Industrial Microbiol. & Biotechnol.*, 33: 545-551.
- Wehr M.** (2006) Bakterielle Aufnahme, Selektivität und interne Prozessierung bei marinen Porifera. Dissertation, Universität Würzburg.
- Weinheimer A.J.** & Spraggins R.L. (1969) The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *Chemistry of coelenetrates XV. Tetrahedron Lett.*, 15: 5185-5188.
- Weissenfels N.** (1978) Bau und Funktion des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis* (L.) (Porifera). V. Das Nadelskelett und seine Entstehung. *Zool. Jahr Abt. Anat. Ontog. Tiere*, 99: 211-223.

-
- Weissenfels** N. (1989) Biologie und mikroskopische Anatomie der Süßwasserschwämme (Spongilidae). München, Urban & Fischer.
- Weissenfels** N. & Landschorff H.W. (1977) Bau und Funktion des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis* (L.)(Porifera). IV. Die Entwicklung der monaxialen SiO₂-Nadeln in Sandwich-Kulturen. Zool. Jahr Abt. Anat. Ontog. Tiere, 98: 355-371.
- Weissenfels** N. & Langenbruch, P.-F. (1985) Langzeitkulturen von Süßwasserschwämmen (Porifera, Spongillida) unter Laborbedingungen. Zoomorphol., 105: 11-15.
- Wells** H.V., Wells M.J. & Gray I.E. (1964) Ecology of sponges in Hatteras Harbor, North Carolina. Ecology, 45: 752-767.
- Westheide** W. & Rieger R. (1996) Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Wijffels** R., Osinga R., Pomponi S.A. & Tramper J. (2001) Marine sponges as biocatalysts. In: Cabral, Mota & Tramper (ed) Multiphase bioreactor design. London, Taylor & Francis: 477-493.
- Wilkinson** C.R. (1978) Microbial association in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. Mar. Biol., 49: 161-167. II. Numerical analysis and water bacterial populations. Mar. Biol., 49: 168-176. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. Mar. Biol., 49: 177-185.
- Wilkinson** C.R. (1979) Nutrient translocation from symbiotic cyanobacteria to coral reef sponges. In: Levi & Boury-Esnault (ed) Biologie des spongiaires. Colloques Internationaux du CNRS, Editions du CNRS, Paris : 373-380.
- Wilkinson** C.R. (1983) Net primary productivity in coral reef sponges. Sciences, 219: 410-412.
- Wilkinson** C.R. & Fay, P. (1979) Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic bacteria. Nature, 279: 527-529.
- Wilkinson** C.R. & Vacelet J. (1979) Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 37: 91-104.
- Wilkinson** C.R. & Garrone R. (1980) Nutrition in marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. In: Smith & Tiffon (ed) Nutrition of lower metazoa. Pergamon Press, Oxford: 157-161.
- Willenz** P., Vray B., Maillard M.P., & van de Vyver (1986) A quantitative study of the retention of radioactive labelled *E. coli* by the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. Physiol. Zool., 59: 495-504.
- Willmer** P. (1994) Invertebrate relationships. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wilson** H.V. (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool., 5: 245-258.
- Yahel** G., Sharp J.H., Marie D., Häse C. & Genin A. (2003) *In situ* feeding and element removal in the symbiont-bearing sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC is the major source for carbon. Limnology and Oceanography, 48(1): 141-149.
- Zeeck** A., Bach G. & Terlau H. (2001) Das medizinische Potential von Naturstoffen. Internist, 42: 1422-1427.

Zhang W., Zhang X., Cao X., Xu J., Zhao Q., Yu X., Jin M. & Deng M. (2003) Optimizing the formation of *in vitro* sponge primmorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata*. J. Biotechnol., 100: 161-168.

Zhang X., Le Pennec G, Steffen R., Müller W.E.G. & Zhang W. (2004) Application of a MTT assay for screening nutritional factors in growth media of primary sponge cell culture. Biotechnol. Prog., 20: 152-155.

Zhao Q., Zhang W., Jin M., Yu X. & Deng M. (2005) Formulation of a basal medium for primary cell culture of the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. Biotechnol. Prog., 21(3): 1008-1012.

7.2 Internetseiten

- Aquariencomputersoftware zum Programmieren und Auslesen des IKS-Aquastar®
www.iks-aqua.com/index.html
www.matuta.com
- Alpha Innotech, Alpha Imager, Alpha Ease Software
www.alphainnotech.com
- GBIF Global Biodiversity Information Facility - Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist: World Porifera Database - Daten zur Verbreitung von *S. massa* im Mittelmeer
<http://data.gbif.org/species/14698727>
- Homepage des Forschungsprojektes `BIOTECmarin II`
www.biotecmarin.de
- Homepage des Instituts für Meeresforschung, „Ruder Bošcovič ” Rovinj, Kroatien
<http://more.cim.irb.hr/>
- Jährlicher Report der neu-isolierten und beschriebenen bioaktiven Substanzen - Annual Report of new isolated and described bioactive substances
www.rsc.org/npr
- Karl Roth AG Internetseite für Produktinformationen
www.carl-roth.de/website/de-de/ueberuns/main_layout_ueberuns_niederlassungen.jsp?lang=null&catId=null
- Marine Life Information Network: Biology and sensitivity key information sub-program. Marine Biological Association, UK
<http://www.marlin.ac.uk/species/Suberitesmassa.htm>
- NCBI Search: Core Nucleotide Gendatenbank
www.ncbi.nlm.nih.gov/
- NCBI GenBank
www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
- Sigma-Aldrich Internetseite für Produktinformationen (bspw. RPMI-Medium)
www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Germany.html

-
- Internetseiten zur “Wodkamethode”
<http://archiv.korallenriff.de/alkoholmethode.html>
<http://archiv.korallenriff.de/alkoholmethode5.html>
http://www.korallenriff.de/artikel/514_Die_Wodkamethode_Teil_2.html

8. Danksagung

Zu aller Erst möchte ich Herrn Prof. Ch. Syldatk, meinen Dank für die Betreuung, die Unterstützung und Hilfestellung bei vielen Problemen die auftraten aussprechen. Er war stets am Fortgang der Dissertation und den Ergebnissen der Versuche interessiert und half durch viele gute Ratschläge und Diskussionen. Auch kleinere Missverständnisse wurden toleriert und entschuldigt, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Herrn Prof. C. Posten danke ich für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters der Dissertation.

All meinen Kollegen vom Lehrstuhl Technische Biologie, besonders Herrn Dr. R Hausmann, möchte ich für die interessante und lehrreiche Zeit am Fachbereich danken. Ohne sein scheinbar unbegrenztes Wissen über die biotechnologische Kultivierung von Schwämmen und auch auf anderen Gebieten, wären viele Versuche und Entscheidungen anders ausgefallen. Daneben möchte ich mich bei Frau Dr. A. Neumann bedanken, die mir u. a. bei der Lösung von genetischen Fragestellungen von großer Hilfe war. Ebenso möchte ich Herrn Dr. J. Rudat und A. Politzer für die vielen Besprechungen über molekularbiologische und genetische Problematiken und verwandte Themen danken, die mir bei der Lösung von verschiedenen Problemen, z.B. dem Primerdesign sehr geholfen haben bedanken. Bei meiner Kollegin Frau B. Gerçe und ihrer Studienarbeiterin B. Himmel möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung verschiedener PCR-Ansätze, der FisH-Sondenherstellung und Testung herzlich danken. Auch meinem Kollegen in der AG Herrn Rühle gebührt Dank, von dem ich einiges über die Aquarientechnik, Aquarienhaltung verschiedener Tiere, die technischen Voraussetzungen und die Energie- und Sauerstoffsverbrauchsmessung lernen konnte. Nicht zuletzt waren beide Kollegen immer verlässliche Tauchpartner, beim Sammeln der Schwämme in Kroatien.

Daneben möchte ich einen sehr herzlichen Dank an Frau S. Baumann für ihre Hilfe bei vielen verschiedenen Problemen aussprechen und an unserem Werkstattleiter Herrn S. Almstedt für das Herstellen der vielen, verschiedenen Bauteile, z.B. der Kultivierungsmodule, die er trotz aller gewünschten Änderungen in kürzester Zeit anfertigte. Außerdem möchte ich mich bei Frau A. Hochmuth bedanken, die mit der Erledigung und dem Arrangement von vielen kleinen Dingen Anteil an der Vollendung der Arbeit hat.

Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn H. Gotzmann und Herrn W. Mandel für die vielen Dinge, die sie für mich bestellt oder beschafft haben. Auch allen anderen hier nicht namentlich aufgeführten Kollegen möchte ich für die Hilfe und ansprechende Atmosphäre am TeBi während der Promotionszeit danken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Th. Schwartz vom Forschungszentrum Karlsruhe bedanken, der mit mir verschiedene Aspekte der DGGE und anderer Methoden erörtert hat und der mir viele Tricks und Kniffe in deren Anwendung mit stoischer Ruhe erklärt hat.

An weiterer herzlicher Dank geht an Dr. E. ter Haseborg, ohne dessen tatkräftige Unterstützung ich nicht in der Lage gewesen wäre, die Untersuchungen und Aufnahmen der Immobilisierung und BrdU-Versuche durchzuführen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. J. Kaluza von Olympus (am EMBL Heidelberg) für die Möglichkeit danken, meine BrdU-Proben auf den neuesten Mikroskopen der Firma untersuchen zu dürfen.

Unserem Aquarienexperten und Konstrukteur der Kultivierungsbecken Herrn C. Schumacher gebührt ebenfalls ein großes Dankeschön für die anregenden Diskussionen und den aufopfernden Einsatz, alle Ansprüche und Verbesserungswünsche in die Realisierung der Kultivierungseinheiten einzubauen. Durch seine manchmal unkonventionellen Ideen wurden völlig neue Aspekte in der Erforschung zur Kultivierung aufgeworfen, die außerhalb der gängigen Lehrmeinung lagen, aber nichtsdestotrotz sehr interessant und innovativ waren.

Herrn H. Kirchhauser vom Vivarium Karlsruhe möchte ich meinen Dank für die fantastische Zusammenarbeit und Bereitstellung von Probenmaterial, sowie für seine Bereitschaft aussprechen, Teile unseres Probenmaterials in seinen Aquarien für Vergleichszwecke zu kultivieren.

Allen Kollegen der anderen Arbeitsgruppen im BMBF-Projekt BIOTECmarin II möchte ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit danken: besonders bei Herrn Prof. Müller als Projektkoordinator möchte ich bedanken, daneben auch bei den Kollegen der Uni Stuttgart: Prof. F. Brümmer, Dr. M. Pfannkuchen, A. Klöppel, G. Fritz, der Uni Würzburg: Dr. U. Hentschel, K. Bayer, Dr. S. Schmidt, H. Angermeyer, Dr. M. Wehrl, der Uni Düsseldorf: Prof. P. Proksch, Prof. R. Ebel, A. Putz, der Uni Kiel: Prof. Imhoff, Dr. A. Muscholl-Silberhorn, Dr. V. Thiel, T. Staufenberg und den weiteren Kollegen von der Uni Mainz: Prof. Prof. H.C. Schröder, Dr. M. Wiens und deren Mitarbeitern.

Den kroatischen Kollegen danke ich für die tolle Zusammenarbeit und war für die Bereitstellung von Geräten und Material, aber auch für die Lösung und Machbarkeit verschiedener Probleme sehr, sehr dankbar.

Allen voran bedanke ich mich sehr herzlich bei Prof. R. Batel, für seine Unterstützung und Freundschaft, sowie sein Interesse an meiner Arbeit, des Weiteren Herrn Dr. A. Jaklin für die spannenden Tauchgänge und die Überlassung und Nutzungsrechte der fantastischen Unterwasseraufnahmen. Nicht zu vergessen all die kroatischen Freunde, Nevenka, Bojan, Milena, Drasko, Bela, Dario und allen Anderen, für die fabelhafte Zusammenarbeit und Hilfe bei der Probenbeschaffung, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft die Zeit vor Ort sehr angenehm machten. Es war mir jedes Mal eine Freude in Rovinj sein zu dürfen und mit Euch zu arbeiten!

Mein herzlichster Dank geht aber an Dr. K. Barz in Bremerhaven. Sie hat mir während der ganzen Doktorandentätigkeit den Rücken gestärkt und mir durch ihre Zuneigung vieles erträglicher gemacht, nicht zuletzt die räumliche Distanz zwischen Karlsruhe und Bremerhaven. Viele Ideen habe ich zuerst mit ihr diskutiert und erst danach in die Tat umgesetzt. Auch allen Freunden in Karlsruhe (besonders Ronny und Tabea), Heidelberg (Björn & Jeanette), Bruchsal (Fam. Matthes), Rostock, Halle und den ehemaligen Kollegen in Bremerhaven möchte ich danken, denn sie waren mir stets eine moralische Stütze, die mir in nachdenklichen Zeiten sehr geholfen und mich in meinen Entscheidungen bestärkt haben.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mir während meiner Promotionszeit tatkräftig geholfen und mich unterstützt haben und die hier nicht namentlich aufgeführt sind.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie - meiner Mutter, meinem Bruder und meinem schon 1993 verstorbenen Vater, die immer an mich geglaubt und mich uneingeschränkt in allen Zeiten unterstützt haben!

Das Promotionsvorhaben wurde als Teil des BMBF-Projects *BIOTEC*marin II ausgeführt, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF, Förderkennzeichen 03F0414/G.

9. Appendix

9.1 Ernährung der Schwämme während der Kultivierung

9.1.1 Eingesetzte Organismen zur Ernährung der Schwämme

In runden Klammern angegeben die Abkürzungen für die verwendeten Futterorganismen und in eckigen Klammern das verwendete Medium zur Kultivierung.

- *Synechococcus* sp. (Syn) [F/2]
- *Phaeodactylum tricornutum* (Phaeo) [F/2]
- α -Proteobakterium, Gram-negativ (SB 89) [MMR 1]
- *Vibrio* sp. (SB 177) [MMR 1]
- Actinobakterium *Janibacter limosus* (Hel 01) [MMR 1]
- γ -Proteobakterium, *Halomonas variabilis* (Hel 04) [MMR 1 bzw. MMR 2]

9.1.2 Nährmedien für die Futterorganismen

Die Futterorganismen wurden in den folgenden Medien, kultiviert:

F/2 Medium (modifiziert nach GUILLARD & RYTHER 1962, GUILLARD 1975)

Tab. A 1a: Überblick über die Zusammensetzung der Nährmedien für die Kultivierung der Futterorganismen.

Chemikalie	Einwaage [g/l]	genutzte Menge [ml]
NaNO ₃	75,0	1.0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,0	1.0
F/2 Spurenelement-Lösung	s. u.	1.0
F/2 Vitamin Lösung	s. u.	0.5
Filtriertes ASW		1000

Endvolumen: 1 l ASW (0,22 μ m sterilfiltriert) wird Biotin und Spurenelementlösung zugegeben, anschließend sterilfiltriert.

F/2 Spurenelement-Lösung

Tab. A 1b: ...weiter von Tab. 1a.

Chemikalie	Einwaage [g/l]	genutzte Menge [ml]
FeCl ₃ ·6H ₂ O		3,15 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9,8	1,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6,3	1,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,0	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0	1,0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0	1,0
VE - Wasser		1000

Lösung wird sterilfiltriert (0,22 µm) und in sterile Falcontubes abgefüllt.

F/2 Vitamin Lösung

Tab. A 1c: ...weiter von Tab. 1a.

Chemikalie	Einwaage [g/l]	genutzte Menge [ml]
Vitamin B ₁₂	1,0	1,0
Biotin	0,1	10,0
Thiamin - HCl		200,0 mg
VE -Wasser		1000

Lösung wird sterilfiltriert (0,22 µm), in sterile Falcontubes abgefüllt und eingefroren.

MMR 1 Medium (Zobell-Medium) nach DIFCO 2216 Anleitung

Tab. A 1d: Zusammensetzung des MMR 1 Mediums

Chemikalie	Einwaage [g/l]	genutzte Menge [ml]
Pepton oder Trypton	5.0	1,0
Hefeextrakt	1.0	1,0
(Agar)	15.0	0,5
Filtriertes ASW	~42,5 g Salz	1000

Die Chemikalien in 250 ml VE-Wasser lösen und danach zu 750 ml ASW geben.

MMR 2 Medium

Tab. A 1e: Zusammensetzung des MMR 2 Mediums (pH-Wert: ~7,2 - 7,4)

Chemikalie	Einwaage [g/l]	genutzte Menge [ml]
Glucose	1,0	1,0
Pepton	0,5	1,0
Hefeextrakt	0,1	1,0
Ammoniumnitrat	1,0	1,0
Filtriertes ASW	30-33 g Salz	1000

9.2 Lösungen und Geräte (für die einzelnen Versuche)

Fragmentversuche

- ASW (künstliches Seewasser), Tropic Marin, Dr. Biener GmbH
- Silizium- / Silikat- / Kieselsäuretest

Tab. A 2: Verwendete Chemikalien, um den Silikatgehalt (angesetzt als Natronwasserglaslösung in ASW), in der Lösung zu bestimmen, die für die Kultivierung von Fragmenten, Reaggregaten und Gemmulae als Si-Quelle eingesetzt wurde.

Chemikalie	Hersteller	Bemerkung / Prod.-Nr.
Si Standardtest	VWR	1.099.470.001
Silikat-/ Kieselsäuretest	VWR	1.147.940.001
Natronwasserglas	VWR	1.056.212.500
Nitratstest	VWR	1.100.200.001

Tab. A 3: Überblick über die Chemikalien und Aminosäuren mit denen das RPMI-1640 Medium angereichert und damit für die Kultivierung von Schwämmen angepasst wurde.

Chemikalie	Menge [g]	Hersteller	Bemerkung / Prod.-Nr.
NaCl	13,43	Roth	9265.2
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	5,07	Fluka	63065-1kg
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1,1	Roth	5239.1
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	6,981	Fluka	63136-250g
NaBr	0,016	Merck	1.063.630.100
Na ₂ F ₆ Si	0,0023	Merck	1.05621.2500
L - Asparaginmonohydrat	1,272	Merck	1.015.660.100
L - Asparaginsäure	1,31	Roth	T202.1
Glutaminsäure	1,45	Roth	3774.1
Glycin	0,74	Roth	3774.1
L - Prolin	1,13	Roth	T205.1
L - Serin	1,02	Roth	4682.1
Taurin	0,122	Roth	4721.1
Ascorbinsäure	0,150	Merck	127

- 100 % EtOH, unvergällt
- RPMI 1640 - Medium (Sigma-Aldrich, R8758 6 * 1 l)
- H₂O₂ Lösung zur Oberflächensterilisation 5 % (w/v) in ASW
- NaClO Lösung zur Oberflächensterilisation 5 % (w/v) in ASW
- Xylol

Gemmulae

24-Loch-Platten - Versuch 1 und 2 (2a-d)

Tab. A 4: Verwendete Medien und Materialien für den 24-Loch-Platten - Versuch 1 und 2.

Chemikalie	Hersteller	Bemerkung / Prod.-Nr.
24 well Plates	Roth	CE55.1, 3 ml Volumen / well
ASW	Dr. Biener AG	sterilfiltriert (0,22µm)
RMW		sterilfiltriert (0,22µm)
SMW	Sigma-Aldrich	S-9148 1 L

Immobilisierung

Lebendnachweis der Schwammzellen - Inkubation mit BrdU

- ASW
- CMFSW (Ca²⁺ - / Mg²⁺ - freies Seewasser) nach MÜLLER *et al.* (1978)
Mit HCl auf pH 8,2 eingestellt und sterilfiltriert (0,22 µm)
- 3,5 %iges Natrium - Alginat, gelöst in CMFSW (Fluka, 71238-50 g)
- 3,5 %iges Cellulosesulfat, gelöst in ASW (von der TU Berlin)
- 0,5 M CaCl₂
- Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich, 23.472-9)
- 25ml Glasflaschen (Schott), autoklaviert

Tab. A 5a: Überblick über die für den BrdU-Assay verwendeten Chemikalien und Antikörper, Hersteller, Spezifikationen und Produktnummer.

Gerät / Chemikalie	Hersteller	Bemerkung / Prod.-Nr.
BrdU - Salz	Sigma-Aldrich	B5002 - 5 g
Anti-BrdU, monoklonal, Klon BU-33	Sigma-Aldrich	B8434 - 200 µl, aufgereinigtes Maus- Immunglobulin
Anti-Maus AK (IgG) γ- kettenspezif., FITC gelabelt	Sigma-Aldrich	F8264 - 0,5 ml Affinitäts-isoliertes Antigen, spezifischer AK, in Ziege produziert

Tab. A 5b: Eingewogene Chemikalien zur Herstellung der PBS-Lösung.

Gerät / Chemikalie	Hersteller	Menge [g]
NaCl	Sigma-Aldrich	8
KCl	Sigma-Aldrich	0,2
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	1,44
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	0,24

In 800 ml VE-Wasser lösen, auf pH 7,4 einstellen, auf Endvolumen 1000 ml auffüllen, autoklavieren.

- 100 µM BrdU
- PDADMAC - Tropflösung (Poly-diallyl-dimethylammoniumchlorid)(Sigma-Aldrich, 40901 - 4, 1l, niedermolekular (MW: 100.000-200.000) in ASW (Mischungsverhältnis PDADMAC und ASW = 2 : 1)
- Inkubationspuffer (0,5 % BSA; 0,1 % Tween 20 in PBS)
- 70% EtOH
- Paraffin (Schmelzpunkt bei 56°C) (Plano, L 4132)
- Roticlear, zum Auflösen des Paraffinwachs (Roth AG, A538.1)
- Frostträger (Menzel GmbH & Co. KG, J1800AMNZ)
- Objektträger beschichtet mit „Hauptkleber“

Tab. A 6: Benötigte Chemikalien für die Herstellung von „Hauptkleber“, zum Beschichten von Objektträgern.

Reagenz	Menge
Gelatine	1 g
Aqua dest.	100 ml
Glycerin	15 ml
Phenol oder Gentamycin	2 g

→ verpilzt schnell, kann aber eingefroren werden! Zum Beschichten die Lösung erwärmen und Objektträger in die Lösung tauchen - anschließend bei RT trocknen lassen.

PCR

DNA - Extraktion

- DNA - Extraktionskit Fast DNA Spin Kit for soil, MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA
- Vortex Heidolph, Reax 10p
- Tischzentrifuge Eppendorf, 5417 C

Primer für *Suberites domuncula* (100 pmol μl^{-1})

Sub 1F: 5` - AGC CCC GTG TGC GAC ACC - `3

Sub 2F: 5`-AGC TGC CGA CTC CTC TGC - `3

SPO_SO1R: 5` -CAC T(AGT)G GA(AG) CCC CGG CAT TC - `3

Primer für *Axinella polypoides* (100 pmol μl^{-1})

AXN GR1F: 5` -CAG GCT CCS YM GGG GC - `3

AXN GR1R: 5` -AGC CCC GGC ATT CCK SG - `3

AXN PO2F: 5` -TAG CCA GTG CAA GGC TGG AG - `3

AXN PO3F: 5` -CTT AGA GCC TCC GAC TGG TTT CG - `3

AXN PO4F: 5` -AGA GCC TCC GAC TGG TTT CG - `3

SPO_SO1R: 5` -CAC T(AGT)G GA(AG) CCC CGG CAT TC - `3

Chemikalien für PCR

- 10 mM dNTP's (Fermentas)
- PCR Wasser (Roth AG, T 143.3)
- 10x Taq Puffer + (NH₄)SO₄ - KCl (Fermentas)
- 1,5 mM MgCl₂ (Fluka, ,63065-1kg)
- Taq-Polymerase (Fermentas, #EP0402)
- 1 - 2 % iges Agarosegel, Agarose in TAE gelöst (Roth AG, GTQ 6352.2)
- Loading Dye (Fermentas, #R0611)
- TAE - Puffer (1 %)
50x Stocklösung bestehend aus: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), mit H₂O_{bidest} auf 1000 ml auffüllen. Als 1x Lösung verwenden.
- Ethidiumbromid (EtBr) - 1 %ige Lösung in Wasser (Roth AG, 2218.3)
100 µl dieser Lösung in 1 L VE - Wasser
- Heizblock
Eppendorf, Mastercycler `gradient`
- Gel - Elektrophorese
Bio-Rad, Model 200/2.0 Power Supply + Gießkämme und Gießwanne
- Schütteltisch für Agarosegele Heidolph, Polymax 1040
- Lesegerät für Agarose-Gele Biozym, Alpha Imager 2000, Version 3.21

9.3 Allgemeine Materialien

- **Aquarien**
 - Kultivierungsbecken (Becken A - F) (78*78*20 cm) + Filterbecken (40*35*35 cm)
Wasservolumen: ~ 171 dm³
 - Kultivierungsbecken (Becken H) 8 obere Versuchsbecken: 12*8*80 cm, 8 untere Einzelbecken: 11,5*9*80 + Filterbecken (80*45*25 cm) Wasservolumen: ~ 218 dm³
 - Kultivierungsbecken (Becken I - J) (118,5*58,5*18 cm) + Filterbecken (78,5*38,5*24 cm) Wasservolumen: ~ 197 dm³

-Durchflussbecken in Kroatien, (37*75*21 cm) (2 Becken) Wasservolumen: je 58,3 dm³; Durchflussmengen: beleuchtetes Becken ~ 190 l h⁻¹, abgedunkeltes Becken ~ 150 l h⁻¹

- 12 l Kleinaquarien
- Aquarienpumpen
 - AquaBee UP 1000 (1000 l / h)
 - Eheim compact 1000, 1001, 1002 (150-1000 l / h)
 - Eheim, Typ 1000.220 (300 l / h)
 - Eheim, Typ 1001.220 (600 l / h)
 - Eheim 1250, 3250
 - Tunze Turbelle stream 6060, 6080
 - Tunze Magnethalter für Turbelle 6080.50
 - Membranpumpen (zum Belüften → Luftpumpen Schego M2K3, WS2, WS3 (Schemel & Goetz GmbH & Co KG Elektrogerätebau, Offenbach am Main)
- Abschäumer Ultra Skim 1, mit vergrößertem Abscheidertopf, (550 - 1000 l / h)
- Ozonisatoren Sander, Certizon (C25, 50, bzw. 100 mg O₃ h⁻¹)
- UV-C Klärer Trop Tronic, Trop UV Entkeimer Typ 6 / IV – TPE (85 Watt)
- Kühler Aquamedic, Titan 500
- IKS Aquariencomputer inkl. Software V 2.0 bzw. 2.xx + Steuer- und Messelektroden (pH, Redox, O₂, Leitwert (LW), Temperatur), Magnetventile, schaltbare Steckdosenleisten, zusätzliche Software zum Programmieren der IKS Aquastar Aquariencomputer MATUTA - TIMO
- Tageslichtstrahler Gewiss, Titano IP 66 250 / 400Watt, Trilux 798 Winlight Q
- Tageslichtstrahler / Neonröhren Breßlein Leuchtbalken + Osram Tageslichtleuchten, 18 Watt
- Magnetrührer Gerhardt, Modell RMH (500 Watt) und Rührfische, Rührfischangel,
- Zentrifuge Beckmann-Coulter, Avanti J-30 I
- Zentrifuge für 15 bzw. 50 ml Falcontubes Heraeus, Multifuge 1 S-R
- Thermoschüttler Infors Multitron II
- Digital pH-Meter
 - WTW inoLab pH Level 1
 - WTW pH-Meter 526
 - WTW pH-Meter 538

-
- Digital Salinitätsmesser Knick Typ 911 Cond, Portamess
 - Zelläzahlgerät Innovatis, Schärfe System, CASY, Modell TT
 - TOC / DOC / POC - Analyser Shimadzu, TOC-V_{CPN}, ASI-V

Bild- und Dokumentationstechnik

- Fluoreszenzmikroskop Zeiss, HBO Imager Z1, Apotome, Power supply AxioCam MRm
- Mikroskop Nikon, Eclipse E200, mit Adapter für Kameraaufsatz auf Mikroskop oder Stereomikroskop
- Stereomikroskop Olympus, SZ 61 (Modellreihe SZ2 - ST / ILST) + Schwanenhalslicht KL 1500 LCD mit Adapter für Kameraaufsatz (Nikon MCD Lens MRP-70040)
- Digitalkameras
 - Nikon, Coolpix 995 (3,34 Megapixel)
 - Canon Powershot A 80
- Canon UW-Gehäuse für A 80 WP-DC 900
- Alpha Innotech / Biozym Alpha Imager 2200, v. 3.21, Alpha Ease FC

9.4 Weitere Hilfsmittel

- Waagen, Sartorius BP 31005 und BP 211D
- Feinwaage, Mettler Toledo AT261 Delta Range
- Kühlschränke (4 °C, -20 °C, -80°C)
- Faltenfilter Maschenweite 20 µm, Rundfilter Ø 125 mm, (Schleicher & Schuell, Dassel, Ref. 311511)
- 0,45 bzw. 0,22 µm Bottletop-Sterilfilter (Nalgene, 1000 ml)
- Gaze zum Filtrieren mit 100 µm, 55 µm, 50 µm 40 µm Maschenweite
- Handelsübliches Plastik-Küchensieb, Maschenweite 500 µm
- 24-Loch-Platten (24 well Plate, steril, No. 662 160) (erhältlich über Roth AG, Greiner Bio-One)
- Reaktionsgefäße, Falcontubes (15 und 50 ml) und Rack

-
- Eppendorf Cups (200, 500, 1000 und 1500 µl Vol.) (Eppendorf AG, Hamburg)
 - Eppendorf Pipetten und Spitzen
 - Elektronische Zeitschaltuhren
 - Thermometer
 - Hauskühlanlage und Glaskühlschleifen
 - Lichtgitter
 - Absperrventile
 - PVC - Verrohrung der Aquarientechnik
 - Krebs- und Fischfutter
 - Gefrorene Tintenfischtuben



Marine Schwämme stellen Quellen neuer Naturstoffe dar, die als Vorlage für die Entwicklung von Wirkstoffen in der Humantherapie dienen können. Für umfangreiche Studien der Wirkung und chemischen Struktur werden größere Mengen der Naturstoffe benötigt. Aufgrund verschiedener Umstände ist die umfassende Versorgung mit Schwammbiomasse nicht möglich, könnten aber durch eine gezielte, biotechnologische Kultivierung von Schwämmen ex-situ produziert werden.

Zielsetzung dieser Studie waren die Entwicklung neuer und die Optimierung bereits angewandeter Methoden zur ex-situ Kultivierung von Schwämmen. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Kultivierungsfaktoren, z.B. Wassertemperatur, auf die Schwämme untersucht und Möglichkeiten zur exakten Bestimmung des Wachstums und der Biomasse der kultivierten Schwämme getestet.