

Sebastian Rühle

Grundlegende Untersuchungen zur biotechnologischen Kultivierung von Schwämmen

Massenbilanzierung bei *Aplysina aerophoba*



Sebastian Rühle

**Grundlegende Untersuchungen zur biotechnologischen
Kultivierung von Schwämmen**

Massenbilanzierung bei *Aplysina aerophoba*

Grundlegende Untersuchungen zur biotechnologischen Kultivierung von Schwämmen

Massenbilanzierung bei *Aplysina aerophoba*

von
Sebastian Rühle



universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)

Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2008

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: 978-3-86644-342-6

Grundlegende Untersuchungen zur
biotechnologischen Kultivierung von Schwämmen

-

Massenbilanzierung bei
Aplysina aerophoba

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

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

genehmigte
DISSERTATION

von
Diplombiologe Sebastian Rühle
aus Freiburg i. Br.

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk
Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten
Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 2008

"Wenn du ein Schiff bauen willst, dann trommle nicht Männer zusammen, um Holz zu beschaffen, Werkzeuge vorzubereiten, Aufgaben zu vergeben und die Arbeit zu verteilen, sondern lehre sie die Sehnsucht nach dem weiten endlosen Meer."

Antoine de Saint-Exupéry

Für Nora

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syl-datk für die Aufnahme in den Arbeitskreis BIOTECmarin und seine liberale Gangart die, verbunden mit den hervorragenden technischen Voraussetzungen am Institut, die Grundlage für die Arbeit der letzten drei Jahre geschaffen hat.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr.-Ing. Rudolf Hausmann danke ich für seine freundliche und konstruktive Kritik bei allen versuchrelevanten Fragestellungen, der Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizontes auf die Sichtweise eines Ingenieurs und die hilfreiche Unterstützung bei der Korrektur der Manuskripte.

Bei Frau Sandra Baumann bedanke ich mich für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Laboralltag. Bedanken möchte ich mich auch für ihre offene und freundschaftliche Art, mit der sie wesentlich zur angenehmen Atmosphäre am Institut beigetragen hat.

Herrn Siegfried Almstedt aus der Werkstatt für seine Hilfsbereitschaft und die stets prompte Umsetzung aller meiner Anliegen.

Herrn Matthias Voigt danke ich für seine Hilfe als Tauchpartner bei zahlreichen Tauchgängen bei der Sammlung des Probenmaterials.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Meeresbiologischen Institutes Ruđer Bošković in Rovinj für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei den Tauchgängen sowie der Nutzung ihrer Einrichtung.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bei allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern für das kollegiale und freundschaftliche Klima bedanken.

Meiner Frau Anette Pailer danke ich, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat mich dieser spannenden Herausforderung stellen zu können und ihrer Fähigkeit, mir genügend Bodenhaftung zu verleihen, um die Realität nicht aus den Augen zu verlieren.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	11
3 Grundlagen.....	15
3.1 Naturstoffchemie	15
3.2 Biologie der Schwämme.....	20
3.3 Grundaufbau und Funktionsweise	22
3.4 Der Modellorganismus <i>Aplysina aerophoba</i>	24
3.4.1 Biologie	24
3.4.2 Naturstoffe in <i>Aplysina aerophoba</i>	28
3.5 Physiologie	30
3.6 Komposition der organischen Substanzen im marinen Lebensraum	33
3.7 Wachstum von Schwämmen	36
3.8 Assoziierte Mikroorganismen	38
3.9 Respirationsraten	43
3.10 Massenbilanz	45
3.11 Methoden zur Kultivierung von Schwammbiomasse	45
3.11.1 Marikultur	46
3.11.2 <i>Ex-situ</i> Kultur	46
3.11.3 Nahrungsversorgung bei der <i>ex-situ</i> Kultivierung.....	48
3.11.4 Kultivierung von marinen Schwämmen in Aquarien	51
3.11.5 Strömung.....	51
3.11.6 Ursachen und Folgen für das Absterben von Schwämmen	52

4 Material und Methoden	53
4.1 Sammeln und Transport der Versuchsschwämme	53
4.2 Kultivierung funktioneller Schwämme	54
4.2.1 Entwicklung und Konstruktion der Aquarienanlage	55
4.2.1.1 Wasseraufbereitung	58
4.2.1.2 UV-C-Bestrahlung.....	58
4.2.1.3 Abschäumung	58
4.2.1.4 Ozonbehandlung.....	59
4.2.1.5 Beleuchtung.....	59
4.2.1.6 Künstliches Seewasser.....	60
4.2.1.7 Überwachung der Wasserparameter.....	60
4.2.1.8 Aquarienroutine.....	61
4.3 Bestimmung der Schwammbiomasse.....	62
4.3.1 Volumenbestimmung durch Wasserverdrängung.....	62
4.3.2 Volumenbestimmung durch Vermessung.....	63
4.3.3 Bestimmung des Feuchtgewichtes, Trockengewichtes und asche- freien Trockengewichtes der Versuchsschwämme	63
4.4 Filtrationsexperimente	64
4.4.1 Allgemeines	64
4.4.2 Versuchsaufbau.....	64
4.4.3 Partikelkonzentrationsbestimmung.....	65
4.4.4 Verwendete Futterorganismen und Kulturbedingungen.....	66
4.4.5 Kultivierung mariner heterotropher Bakterien.....	67
4.4.6 Kultivierung mariner Mikroalgen.....	68
4.4.7 Meßmethoden zur Erfassung biologischer Stoffumsetzungen	70
4.4.7.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen	70
4.4.7.2 Photosynthese	72
4.4.8 Chemisch-analytische Methoden.....	72
4.4.8.1 Kohlenstoffanalytik	72
4.4.8.2 Vorbereitung der Probengefäße.....	73

4.4.8.3 Vorbereitung der Proben	74
4.4.8.4 Probenahme und Vorbereitung der Meerwasserproben aus der natürlichen Umgebung	74
4.4.8.5 Betriebsparameter	75
4.4.8.6 Detektion	76
4.4.8.7 Kalibrierung.....	76
5 Ergebnisse und Diskussion	77
5.1 NPOC-Messungen in der natürlichen Umgebung.....	77
5.2 Respirationsraten	78
5.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Respirationsraten.....	78
5.2.2 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Respirationsraten	79
5.2.3 Einfluss der Beleuchtungsintensität auf die Respirationsraten.....	80
5.3 Bestimmung des Feuchtgewichtes, Trockengewichtes und aschefreien Trockengewichtes von <i>A. aerophoba</i>	86
5.4 Biomasseverlust über die Kultivierungsdauer.....	87
5.5 Partikelgrößenverteilungen der Futterpartikel.....	90
5.6 Ermittlung der Filtrationsraten	94
5.6.1 Filtrationsversuche mit <i>Synechococcus</i> sp.....	95
5.6.2 Filtrationsversuche mit <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	96
5.7 Kohlenstoffaufnahmeraten	98
5.8 Schlussfolgerungen.....	100
6 Ausblick	103
7 Abkürzungsverzeichnis.....	109
8 Tabellenverzeichnis	111
9 Abbildungsverzeichnis	113
10 Literatur	117

1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde der marine Lebensraum als Quelle zahlreicher neuer Naturstoffe mit besonderen biologischen Eigenschaften, vor allem für pharmazeutische Anwendungen, erforscht. Über 18.000 neue Naturstoffe aus marinen Organismen wurden beschrieben. Schwämme (Porifera) stellen dabei mit etwa 6.700 beschriebenen Substanzen die wichtigste Quelle dar.

Die meisten bioaktiven Naturstoffe erreichen jedoch nur die präklinische bzw. erste klinische Phase, da in der Regel nicht ausreichend Substanzmenge zur Verfügung stehen, um weiterführende Untersuchungen durchzuführen. Gründe sind die geringen Konzentrationen der Naturstoffe im Schwammgewebe in Kombination mit geringen natürlichen Ressourcen an Schwammbiomasse. Die Alternative durch chemische Synthese an ausreichend Substanzmenge zu gelangen scheitert oft aufgrund der komplexen Molekülstrukturen. Ein Ansatz dieses Nachschubproblem zu lösen ist die biotechnologische Produktion von Schwammbiomasse unter definierten und kontrollierten Bedingungen. Die Strategie, die zur Etablierung einer erfolgreichen biotechnologischen Kultivierung von Schwämmen verfolgt wurde, bestand darin, einen geeigneten Modellorganismus zu wählen, der pharmakologisch interessante Sekundärmetabolite produziert sowie Kulturbedingungen zu entwickeln, die das dauerhafte Halten gesunder Schwämme unter Aquarienbedingungen ermöglicht.

Als Modellorganismus wurde der leuchtend gelbe Schwamm *Aplysina aerophoba* aus der Klasse der Demospongiae gewählt. Die Kriterien, die zur Auswahl dieser im Mittelmeer weit verbreiteten Art führten, waren ihre gut untersuchte Naturstoffchemie, die gute Verfügbarkeit durch die Kooperation mit dem Institut 'Ruder Boškovic' und die vergleichsweise guten Kenntnisse ihrer ökologischen Ansprüche. Ihr Vorkommen in geringen Wassertiefen zwischen einem und zwanzig Metern erleichterte das Sammeln. Erste positive Erfahrungen in Aquarienkultur sind dokumentiert.

Schwämme ernähren sich als aktive sessile Filtrierer von partikulärer organischer Substanz wie Pico-, Nanoplankton und Detritus. Diese werden dem umgebenden Wasser entzogen. Die Partikelaufnahme erfolgt hoch effektiv aber unspezifisch im Größenbereich von $0,2 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$. Die im Meerwasser enthaltenen Zellzahlen in der Größenordnung von $5 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ entsprechen einem Kohlenstoffgehalt von etwa $50 \mu\text{g}$ pro Liter und stellen nur ein bis fünf Prozent des gesamten organischen Kohlenstoffes im Meerwasser. Um den Nahrungsbedarf zu decken, müssen daher Wassermengen von bis zum 1000-fachen des Eigenvolumens pro Stunde filtriert werden.

Schwämme zeigen relativ geringe Wachstumsraten, bei *A. aerophoba* etwa eine Verdoppelung der Schwammbiomasse innerhalb eines Jahres. Über die Bestimmung der Massenbilanz wurde versucht zu bewerten, ob es unter künstlichen Bedingungen möglich sein könnte, Wachstum zu ermöglichen. Dazu wurden die Partikelaufnahmeleistungen für zwei Modellfutterpartikel bestimmt. Die sich daraus berechnenden Kohlenstoffaufnahmeleistungen wurden zur Bilanzierung mit den ermittelten Respirationsraten verwendet.

In den durchgeführten Messreihen zur Bestimmung der Respirationsraten wurden Einflussfaktoren wie Temperatur, Kultivierungsdauer und Beleuchtungsintensität einbezogen.

Die ermittelten Respirationsraten lagen für *A. aerophoba* in der Größenordnung von $0,63$ bis $1,25 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und sind vergleichbar mit denen von Reising (1974) publizierten Werte von $0,89$ bis $3,03 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Sauerstoffverbrauchsleistungen mariner Invertebraten sind temperaturabhängig und unterscheiden sich bei unterschiedlichen Schwammarten. Die Ergebnisse der Respirationsleistungen für unterschiedliche Temperaturen zeigten auch für *A. aerophoba*, wie erwartet, eine Zunahme bei ansteigender Temperatur.

Die Untersuchung der Respirationsleistungen in Abhängigkeit der Kulturdauer ergab, dass nach zwei Wochen unter Kultivierungsbedingungen die durchschnittlichen Werte für *A. aerophoba* auf 50% der Ursprungswerte zurückgingen. Als Ursache können Aktivitätsverlust und Degenerationserscheinungen diskutiert werden.

Die Beleuchtungsintensität zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Respirationsraten von *A. aerophoba*. Schwache Beleuchtungsintensitäten von $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ oder weniger führten zu einem Nettosauerstoffverbrauch. Bei höheren Beleuchtungsintensitäten zeigten die untersuchten Schwämme jedoch eine Sauerstoffproduktion. Ab Beleuchtungsintensitäten von etwa $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ zeigten alle untersuchten Schwämme eine Nettosauerstoffproduktion. Diese sind offensichtlich durch die Anwesenheit der im corticalen Schwammgewebe assoziierten photosynthetisch aktiven Mikroorganismen beeinflusst.

Basierend auf den Ergebnissen der Respirationsraten wurde die zu erwartende Biomasseabnahme für Individuen ohne Nahrungsversorgung berechnet. Der gemessene Biomasseverlust stimmte sowohl mit der Kalkulation als auch mit den empirischen Beobachtungen überein. Die Schwämme zeigten eine Abnahme der Biofeuchtmasse zwischen 0,3 % und 0,4 % pro Tag. Entsprechende Werte der Biomasseabnahme wurden auch unter ungünstigen Bedingungen in der Natur beobachtet und bestätigen die Hypothese von Walter Arndt (1928). Er führt als Hauptursache für das Eingehen von Schwämmen in Aquarien die mangelnde Versorgung mit Futterpartikeln auf. Entscheidend sind dabei vor allem Art, Größe und Konzentrationen der zugegebenen Futterpartikel.

Hohe Konzentrationen an Algen und Bakterien führen im Allgemeinen zu einer Reduktion der Filtrierleistung der Schwämme und einer Behinderung der Nahrungsaufnahme durch eine Verstopfung des Kanalsystems. Bei größeren Futterpartikeln ist dies bereits bei niedrigeren Konzentrationen der Fall.

Entsprechende Filtrationsversuche wurden mit zwei typischen marinen Mikroalgen durchgeführt. Es handelte sich dabei um die marine kokkoide Cyanobakterie *Synechococcus* sp. mit einer durchschnittlichen Größe von $1 \mu\text{m}$ und der marinen Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* mit einer durchschnittlichen Größe von $5 \mu\text{m}$.

Die Filtrationsrate von *A. aerophoba* stieg bis zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^6 \text{Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ für *Synechococcus* sp. an. Die maximal gemessene Filtrationsrate lag bei $3,4 \text{mL} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Partikelkonzentrationen über $5 \cdot 10^6 \text{Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ führten zu einem starkem Abfall der Filtrationsraten.

Eine völlige Inaktivität der Versuchsschwämme wurde bei Konzentrationen über $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹ beobachtet. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten der Inhibierung der Filtrationsraten bei der Verwendung von *Synechococcus* sp. zeigten die Schwämme bei *P. tricornutum* Filtrationsaktivität bis zu einer Konzentration von $1,3 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹. Die maximal erreichten Filtrationsraten lagen mit einem Maximalwert von $1,5 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei etwa der Hälfte der für *Synechococcus* sp. ermittelten Raten. Obwohl die Filtrationsraten für *Synechococcus* sp. im Vergleich zu *P. tricornutum* höher waren, ergaben sich für die resultierenden Kohlenstoffaufnahmeleistungen deutlich niedrigere Werte.

Die berechneten Kohlenstoffaufnahmeleistungen für *A. aerophoba* lagen bei Verwendung der Mikroalge *P. tricornutum* bis zu drei Zehnerpotenzen über denen der Cyanobakterie *Synechococcus* sp.. Der Maximalwert der Kohlenstoffaufnahmeleistung pro Stunde betrug für *P. tricornutum* $424 \mu\text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mL}^{-1}$ Schwammfeuchtgewicht.

A. aerophoba ist in der Lage mit *P. tricornutum* als alleinigem Futterorganismus seine Massenbilanz zu decken. Diese Mikroalge scheint als alleinige Nahrungsquelle vielversprechend. Sie findet auch bei Marikulturen als wertvoller Futterorganismus Verwendung. Ob *P. tricornutum* die qualitativen Anforderungen von *A. aerophoba* dauerhaft abdecken kann, bleibt offen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden die quantitativen Grundlagen zum besseren Verständnis des Energiestoffwechsels der Schwämme der Art *A. aerophoba* unter artifiziellen Bedingungen geschaffen.

Zum aktuellen Zeitpunkt der Forschung sind biotechnologische Verfahren zur Produktion schwammspezifischer Naturstoffe kaum oder nur in Grundzügen vorhanden. Es bestätigte sich, dass die *in vivo* Schwammkultivierung eine große Herausforderung darstellt. Es konnte keine Biomassezunahme bei der untersuchten Art *A. aerophoba* erreicht werden, da die erforderlichen hohen Futterpartikelzahlen von Mikroalgen nicht in ausreichender Quantität dauerhaft zur Verfügung gestellt werden konnten. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *A. aerophoba* unter artifiziellen Bedingungen seine Massenbilanz über partikuläre organische Substanzen decken kann. Zusätzlich ist *A. aerophoba* in der Lage,

durch seine assoziierten photosynthetisch aktiven Mikroorganismen bei ausreichender Beleuchtung eine positive Massenbilanz zu erreichen.

Bei der Arbeit zur Kultivierung funktioneller Schwämme konnte mit dem Modellorganismus *A. aerophoba* ein dauerhafter Kultivierungserfolg erzielt werden. Die größte Schwierigkeit bei der Kultivierung des Schwammes *A. aerophoba* besteht darin, dass bei Nahrungsmangel sehr schnell Degenerationserscheinungen auftreten. Die Degenerationserscheinungen führen zum Verlust der Funktionalität, eine Futterpartikelaufnahme ist nicht mehr möglich und die Biomasse wird reduziert.

In Kombination mit den aus dieser Arbeit erstmalig verfügbaren quantitativen Daten für die Massenbilanz von *A. aerophoba* können diese als Grundlagen für weiterführende Untersuchungen in Hinblick auf die qualitativen Wasserparameter dienen, da auch gelöste Wasserinhaltsstoffe das Wachstum von Schwämmen beeinflussen.

Der Einfluss von gelösten organischen Substanzen auf den Metabolismus von Schwämmen ist aus ökologischen Freilanduntersuchungen bekannt. Diese können möglicherweise von Schwämmen aufgenommen werden. Ob sie dabei jedoch einen wesentlichen Beitrag zur Stoffwechselbilanz von Schwämmen leisten, ist nicht eindeutig geklärt und konnte im Umfang dieser Arbeit nicht näher bearbeitet werden.

Bislang existieren keinerlei systematischen Untersuchungen zu Auswirkungen verschiedener Wasserinhaltsstoffe auf Schwämme, aber bei den während der Durchführung der Arbeit gemachten empirischen Beobachtungen zeigte sich ein negativer Einfluss von so genannten Gelbstoffen auf den Kultivierungserfolg. Diese Gelbstoffe akkumulieren im Wasserkreislauf, insbesondere bei den berechneten hohen Futtermengen, und scheinen einen negativen Einfluss auf die Pumpaktivität der Schwämme zu haben.

Die Weiterentwicklung des bestehenden erfolgreich etablierten Systems zur Schwammkultivierung sollte dahingehend überarbeitet werden.

Ein Lösungsansatz könnte die Etablierung einer kontinuierlichen Futterstrategie sein, die in Kombination mit einer kontinuierlichen Wasseraufbereitung die Akkumulation von Gelbstoffen verhindert. Es wäre ein Aufbereitungskonzept vorstellbar, welches basierend auf einer zweistufigen Membranfiltration für den Rückhalt von Bakterien und Algen im Becken sorgt und gleichzeitig zur weitergehenden Elimination höhermolekularer gelöster organischer Stoffe eingesetzt werden kann.

Mit der Kombination des neuartigen Aufarbeitungskonzepts und den in dieser Arbeit ermittelten quantitativen Nahrungsansprüchen von *A. aerophoba*, könnte es zukünftig gelingen, auch die qualitativen Nahrungsansprüche zu untersuchen.

2 Einleitung

Marine Schwämme sind als Quelle zahlreicher neuer Naturstoffe in den Fokus der pharmakologischen Wirkstoffforschung gerückt.

Die Nutzung von Wirkstoffen aus der Natur ist dem Menschen seit Jahrtausenden bekannt. Bis Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wurden pharmazeutisch wirksame Substanzen zum größten Teil aus terrestrischen Pflanzen gewonnen und chemisch weiterentwickelt. In den 1980er Jahren wurden mit Hilfe der kombinatorischen Chemie neue Wirkstoffe konstruiert und optimiert. Gemessen an den Entwicklungskosten und der Anzahl konstruierter Substanzen war die Ausbeute wirksamer und gut verträglicher Pharmazeutika jedoch äußerst gering (Feher and Schmidt, 2003).

Auch heute noch spielen Naturstoffe eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer vielversprechender Medikamente zur Behandlung von Humankrankheiten (Newman and Cragg, 2007). Das durch Bergmann in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckte Arabinose-Nukleosid war die treibende Kraft für die Entwicklung von beispielsweise Ara-A und Ara-C, welche die ersten direkten Anwendungen von Naturstoffen aus marinen Invertebraten als Medikament der Humanmedizin darstellten (Bergmann and Feeney, 1951; Blunt *et al.*, 2008). Aber erst durch moderne Untersuchungsmethoden in den 1990er Jahren eröffnete sich der marine Lebensraum als vielversprechende Quelle bisher unbekannter Naturstoffe für die Humanmedizin. Im Gegensatz zu den terrestrischen Naturstoffen, welche hauptsächlich in Pflanzen gefunden werden, finden sich im marinen Lebensraum diese Naturstoffe überwiegend bei Invertebraten. Schwämme bieten in der Gruppe der marinen Invertebraten das größte Potenzial an neuen Naturstoffen wie zum Beispiel gegen Krebs und AIDS, aber auch vielen anderen Indikationsgebieten.

Die Kultivierung mariner Schwämme begann bereits Ende des 19. Jahrhunderts. Marikulturen dienten der Gewinnung von Badeschwämmen der Art *Spongia officinalis*. Doch nach dem Auftreten epidemieartiger Erkrankungen und der Einfüh-

rung von „Kunstschwämmen“ ging diese Art der Badeschwammgewinnung zurück (Pronzato, 1999).

Mit der Entdeckung zahlreicher neuer Naturstoffe in Schwämmen wurde eine Renaissance der Schwammkultivierung eingeleitet. Heute beschäftigen sich Veröffentlichungen zu neu entdeckten Wirkstoffen in erster Linie mit Naturstoffen aus Schwämmen und es wird ein steigendes Interesse an Stoffwechselprodukten aus deren assoziierten Mikroorganismen verzeichnet (Blunt *et al.*, 2008).

Aplysina aerophoba beispielsweise, die in dieser Arbeit eingehend untersucht wird, enthält einen bromierten niedermolekularen Wirkstoff, das Aeroplysinin-1. Obwohl Aeroplysinin-1 im Handel erhältlich ist, kann es nur durch Extraktion aus Schwammgewebe gewonnen werden.

Doch die geringen Substanzmengen im Schwammgewebe stellen das Hauptproblem für die Entwicklung neuer Medikamente aus Naturstoffen aus Schwämmen dar (Munro *et al.*, 1999). Die gewonnenen Substanzmengen sind für die Durchführung der notwendigen klinischen Studien oft zu gering und verhindern damit weitere Untersuchungen zu den pharmakologischen Eigenschaften dieser vielversprechenden Naturstoffe.

Aus biotechnologischer Sicht lassen sich drei Wege zur Gewinnung von bioaktiven Substanzen aus Schwämmen unterscheiden. Zum einen die Produktion direkter Genprodukte wie Proteine, die üblicherweise durch rekombinante Expression in geeigneten Mikroorganismen produziert werden. Zweitens die Produktion der Sekundärmetabolite durch schwammassoziierte Mikroorganismen, die nach Isolation aus Schwammgewebe in Reinkulturen kultiviert werden. Drittens schwammspezifische Sekundärmetabolite, die ausschließlich durch Extraktion aus Schwammbiomasse zu gewinnen sind. Die weltweit vorkommende Menge an Schwammbiomasse reicht in der Regel nicht aus, um ausreichende Mengen an Naturstoffen zu extrahieren. Aus diesem Grunde wurden unterschiedliche Anstrengungen unternommen, nachhaltige Methoden zur Produktion von Schwammbiomasse zu entwickeln (Osinga *et al.*, 1999).

Eine mögliche Methode, um ausreichende Mengen an Sekundärmetaboliten aus Schwämmen für pharmazeutische Anwendungen bereitzustellen, ist die *ex-situ*

Kultur. Funktionelle Schwämme konnten bisher bis auf wenige Ausnahmen nicht erfolgreich über einen längeren Zeitraum vermehrt werden. Die Gründe hierfür sind jedoch weitgehend unbekannt.

Bereits 1928 vermutete Prof. Walther Arndt, Direktor des Berliner Aquariums, dass im Aquarium gehaltene Schwämme an unzureichender Nahrungsversorgung verenden. Die Auswahl des geeigneten Futters und die Berechnung und Bereitstellung der entsprechenden Futtermenge scheinen ein Schlüsselfaktor für die biotechnologische Kultivierung zu sein (Arndt, 1928).

Als aktive sessile Filtrierer verfügen Schwämme über eine energieeffiziente Ernährungsstrategie und spielen eine wichtige Rolle für die Wasserklärung (Milanese *et al.*, 2003). Die Nahrungsaufnahme erfolgt durch Phagozytose kleinster Partikel von Zoo-, Phyto- und Mikroplankton, Bakterien und Detritus als auch durch Absorption von gelöster organischer Materie (dissolved organic matter, DOM) (Pile *et al.*, 1996; Pile, 1997; Yahel *et al.*, 2003). Dabei unterscheiden Schwämme zwischen den aufgenommenen Futterpartikeln. Nicht symbiotische Bakterien werden im Gegensatz zu symbiotischen Bakterien bevorzugt verdaut, wie Wilkinson *et al.* (1984) an Fütterungsversuchen mit markierten Bakterien zeigen konnte.

Die Pumpleistung von Schwämmen kann pro Tag das 1000-fache des Eigenvolumens betragen. Darum haben Schwämme einen entscheidenden Einfluss auf die Wasserreinigung im Littoral (Reiswig, 1974a). Schwämme haben anderen Filtrieren gegenüber den Vorteil, dass sie nicht nur enorme Mengen an Wasser prozessieren können, sondern die darin enthaltenen Partikel auch sehr effizient zurückhalten. Sie stellen deswegen in nährstoffarme Lebensräumen, wie Korallenriffen, die dominierende Gruppe an filtrierenden Organismen dar (Bergquist, 1978). Für viele Schwammarten ist nachgewiesen worden, dass sie eine große Anzahl an assoziierten Mikroorganismen beherbergen, die sowohl für die Ernährung der Schwämme als auch bei der Bildung der Naturstoffe eine wichtige Rolle spielen (Hentschel *et al.*, 2001; 2003; 2006). Der Anteil dieser Mikroorganismen kann bis zu 40 % der Biomasse eines Schwammes ausmachen.

Unzureichend sind bisher die methodischen Grundlagen um die biotechnologische Kultivierung mit geeigneten Messmethoden im Labor- oder Industriemaßstab zu verfolgen.

Ziel meiner Arbeit war, grundlegende Untersuchungen zur biotechnologischen Kultivierung von Schwämmen am Modellorganismus *A. aerophoba* durchzuführen, die Aussagen über die quantitativen Anforderungen von Schwämmen unter *ex-situ* Bedingungen ermöglichen sollte. Anhand der Bestimmung von Respirationsraten unter verschiedenen Bedingungen wie Temperatur und Beleuchtungsintensität sowie der Ermittlung von Filtrationsraten für ausgesuchte Futterpartikel und damit die Machbarkeit der biotechnologischen Kultivierung beurteilt werden. Durch Bestimmung der quantitativen Randbedingungen sollten Vorschläge zur Auslegung einer Anlage zur Produktion von Schwammbiomasse unter artifizialen Bedingungen abgeleitet werden.

Die Versuche wurden am Modellorganismus *A. aerophoba*, einem weit verbreiteten Schwamm des Mittelmeerraumes durchgeführt. Die Auswahl des Modellorganismus *A. aerophoba* erfolgte aufgrund der guten Verfügbarkeit durch die Kooperation mit dem Institut 'Ruder Bošković' in Rovinj, Kroatien, der Kenntnis der ökologischen Bedürfnisse und dem vielversprechenden Naturstoffpotential dieser Schwammart.

3 Grundlagen

3.1 Naturstoffchemie

Durch seine große Biodiversität ist der marine Lebensraum eine große Quelle interessanter Naturstoffe. Schwämme stellen die Gruppe mariner Invertebraten mit der größten Zahl an interessanten bioaktiven Naturstoffen (Faulkner, 2001). Die extrahierten Moleküle zeigen unter anderem antibakterielle und antivirale Eigenschaften (Faulkner, 2002; Proksch *et al.*, 2003; Mayer and Hamann, 2004). Ara-C, ein aktuelles Medikament in der Phase der klinischen Prüfung für die Behandlung von Krebserkrankungen, ist eine Modifikation eines Naturstoffes der aus dem marinen Schwamm *Tethya crypta* isoliert wurde (Schmitz, 1994).

Schwämme sind durch ihre sessile Lebensweise starkem ökologischen Druck ausgesetzt. Der kompetitive Kampf mit anderen Schwammarten um Lebensraum, das Verhindern von Aufwuchs durch Algen, das Unterbinden von schädlichen Biofilmen durch Mikroorganismen, so genanntes Biofouling, sowie Schutz gegen Fraßfeinde haben zur Evolution verschiedenster chemischer Abwehrstoffe geführt.

In den letzten 30 Jahren lässt sich eine explosive Zunahme an Veröffentlichungen zu neu entdeckten Naturprodukten aus marinen Organismen zu verzeichnen. Mehr als 18.000 Naturstoffe wurden aus marinen Quellen isoliert und beschrieben (Blunt *et al.*, 2008). Jährlich werden hunderte Neue entdeckt, allein im Jahre 2005 wurden 812 neue Naturstoffe publiziert (Blunt *et al.*, 2007). Ihre oft hochkomplexen Molekülstrukturen mit speziellen funktionellen Gruppen sind in terrestrischen Sekundärstoffen unbekannt (Gunasekera *et al.*, 1990; Proksch, 1994; Edrada *et al.*, 1996; Faulkner *et al.*, 2000; Proksch *et al.*, 2003). Die neuen Substanzen zeigen antibakterielle, antikoagulative, antimalariale, antivirale, cytotoxische, fungizide, entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkungen (Mayer and Hamann, 2004).

Im Fokus der Forschung im Hinblick auf ihre pharmazeutische Anwendung finden sich Substanzen wie Stevensin aus *Axinella currugata* und *Teichaxinella*

morchella (Andrade *et al.*, 1999), Halichondrin B aus Arten der Gattung *Halichondrin*, *Axinella*, *Phakellia*, *Lissodendoryx* (Hart *et al.*, 2000) sowie Discodermolid aus dem karibischen Schwamm *Discodermia dissoluta* zur Krebsbehandlung (Gunasekera *et al.*, 1990; Martello *et al.*, 2000) und Sekundärmetabolite aus *Dysidea avara* mit antiviralen Eigenschaften gegen HIV (Faulkner, 2001).

Der Biosyntheseweg der meisten Substanzen ist hochkomplex und weitgehend unklar. Durch die Anwesenheit assoziierter Mikroorganismen in Schwämmen ist es oft schwer zu erkennen, wie es zur Biosynthese der gefundenen Substanzen kommt. Der Naturstoffchemiker John Faulkner untersuchte die Lokalisation der bioaktiven Stoffe in Schwämmen und fand heraus, dass sich sowohl in Bakterienzellen als auch in Schwammzellen bioaktive Substanzen nachweisen lassen. Zum Teil können die Konzentrationen von Sekundärmetaboliten in isolierten Zellfraktionen außerordentlich hoch sein, so dass keine allgemein gültige Aussage zu den Orten der Bildung der Sekundärmetabolite getroffen werden kann (Faulkner, 1999). Drei Entstehungswege zur Bildung der Sekundärmetabolite in Schwämmen werden diskutiert. Zum ersten die direkte Synthese durch die Schwammzellen, zweitens die Bildung durch die assoziierten Mikroorganismen und drittens eine kombinierte Synthese, bei der die Vorstufen in der Schwammzelle produziert und durch ihre Symbionten modifiziert werden.

Vom pharmazeutischen Potential der marinen Naturstoffe ausgehend, könnten in den nächsten Jahrzehnten hunderte neuer Medikamente für die Humanmedizin entwickelt werden. Jedoch ist erst ein Präparat im Handel, das Vidarabin, ein Adenosin-Arabinosid. Dieses Virostatikum stoppt die Replikation der Herpes-simplex- und Varizella-Zoster-Viren (Reiche, 2003). Der Verbreitung einer großen Zahl an bioaktiven Stoffen als Medikament steht das so genannte Nachschubproblem entgegen. Zur Durchführung aller notwendigen klinischen Studien zur Erlangung der Marktreife ist nicht genügend Substanzmenge vorhanden. Dies liegt an den geringen Konzentrationen der Sekundärmetabolite im Schwammgewebe. Eine Verwertung aus natürlichen Ressourcen ist aufgrund der geringen Schwammbiomasse im natürlichen Lebensraum nicht möglich. Diese Problematik soll anhand zweier potenter Naturstoffe skizziert werden.

Ein gegen Haut- und Eierstockkrebs wirksamer Naturstoff, das Halichondrin B (Abbildung 3.1), wurde aus dem Schwamm der Gattung *Lissodendoryx* extrahiert. *Lissodendoryx* sp. enthält 400 µg Halichondrin B pro Kilogramm Feuchtgewicht. Um zum Beispiel 25 % aller Melanompatienten zu behandeln, wäre eine Schwammbiomasse von 7.000 Tonnen notwendig. Aus natürlichen Beständen ist diese Substanzmenge nicht zu gewinnen. *Lissodendoryx* sp. ist ein seltener Schwamm und findet sich ausschließlich vor der Kaikoura Halbinsel (Munro *et al.*, 1999). Dumdei *et al.* (1998) haben errechnet, dass nur 300 Tonnen dieser Spezies in der Natur vorkommen. Der Mangel an ausreichend natürlichen Substanzmengen führte zu Anstrengungen, Halichondrin B synthetisch herzustellen. Durch die Komplexität des Moleküls und der damit verbundenen hohen Anzahl an Syntheseschritten ist eine vollständige chemische Synthese nicht möglich. Es konnten aber einfachere Analoga synthetisiert werden, wie das E7389 (Abbildung 3.1), die ähnliche gute Wirkung wie die Ursprungskomponente zeigen (Towle *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2004). Auf den Webseiten des amerikanischen National Institut of Health (<http://clinicaltrials.gov>) finden sich insgesamt 20 klinische Studien für dieses Halichondrin-Analogon E7389. Insgesamt elf Studien befinden sich in Phase II, wovon sechs in der Rekrutierungsphase und fünf Studien in der Testphase sind. Die Indikationsbereiche sind metastasierender Brustkrebs, Blasenkrebs, Eileiter,- und Eierstockkrebs, Kopf-Hals-Karzinomen, Lungenkrebs, Prostatakrebs, Pankreaskrebs sowie Weichgewebssarkome. Zwei Studien haben bereits die Phase III erreicht und befinden sich in der Rekrutierungsphase für E7389 mit Indikation gegen metastasierenden Brustkrebs.

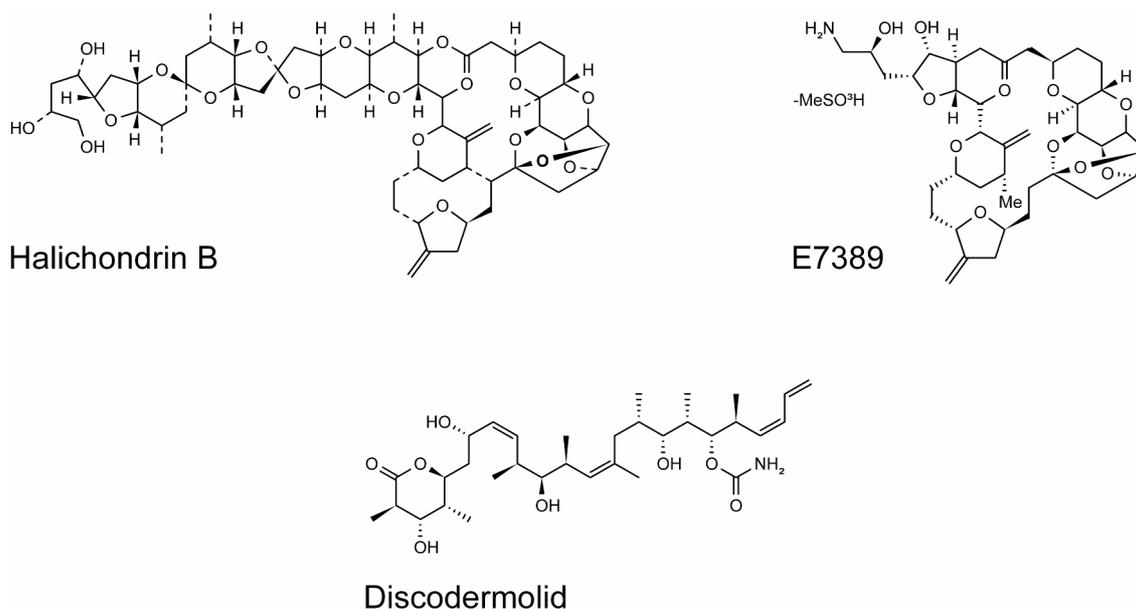


Abbildung 3.1: Strukturformeln der marinen Naturstoffe Halichondrin B mit seinem Strukturanalogon E7389 und Discodermolid.

Ein weiterer vielversprechender Naturstoff, das Discodermolid (Abbildung 3.1), wurde 1990 durch die Arbeitsgruppe um Shirley A. Pomponi, Dr. Sarath Gunasekera und Dr. Ross Longley vom HBOI (Harbor Branch Oceanographic Institution) in Florida, isoliert. Das Schwammgewebe des bis dahin unbeschriebenen, karibischen Schwammes *Discodermia dissoluta* enthält nur 0,002 % des Wirkstoffes, der zudem lichtempfindlich ist. Aus diesem Grunde eignen sich nur Schwämme aus Tiefen unter 33 Meter zur Extraktion dieses Naturstoffes. Die ersten beschriebenen Eigenschaften des Discodermolid waren immunsuppressive und antifungale Wirkungen (Gunasekera *et al.*, 1990). Inzwischen konnte dieser Wirkstoff die Phase I klinischer Prüfungen zur Behandlung von Krebs erreichen. Er besitzt ähnliche Wirkmechanismen wie Taxol[®], ein Wirkstoff aus der Rinde der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia*. Dieser wirkt hemmend auf die Teilung der Mitosespindel in Tumorzellen und führt damit zur Apoptose (de Souza, 2004; Mita *et al.*, 2004). Der Vorteil gegenüber Taxol[®] ist, dass Discodermolid auch bei taxolresistenten Tumoren Wirkung zeigt. Pharmakologische Unterschiede und Details sind von Martello *et al.* (2000) beschrieben. Aber auch hier stoppte der Mangel an ausreichender Wirkstoffmenge weitere klinische Studien dieses vielversprechenden Naturstoffes.

Das HBOI lizenzierte 1998 (+)-Discodermolid an Novartis. Im Jahre 2004 leitete Novartis die klinische Prüfung der Substanz in Phase I ein, die aufgrund der guten Ergebnisse erfolgreich abgeschlossen wurde (Mita *et al.*, 2004). Aktuell scheint die chemische Synthese der einzig gangbare Weg zu sein, um die benötigte Menge von 60 g zu gewinnen. Die von Mickel (2007) beschriebene Synthese umfasst 36 Verfahrensschritte. Die synthetisch erlangte Ausbeute entspricht drei Tonnen Schwammbiomasse, einer Menge die im natürlichen Lebensraum nicht verfügbar ist. Der Aufwand für die beschriebene Synthese ist enorm, pro Kilogramm Wirkstoff werden 300 Tonnen Lösemittel und 1600 kg Silikagel verbraucht. Nur durch die Entwicklung einer Vollsynthese durch die chemische Industrie war es möglich die benötigten Mengen an Wirkstoff zur Durchführung klinischer Studien bereit zu stellen (Mita *et al.*, 2004; Loiseleur *et al.*, 2005; Mickel, 2007; Paterson and Gardner, 2007).

Zur Bewältigung des Nachschubproblems werden unterschiedliche Ansätze diskutiert, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

(1) Die oben beschriebenen Ansätze der chemischen Synthese, bei denen nach erfolgreicher Aufklärung der Molekülstruktur das Problem der chemischen Synthese zu lösen ist. Je komplexer die Moleküle sind, umso mehr Synthesewege sind notwendig, je größer die Zahl der Synthesewege umso geringer die Ausbeute. Oft ist die wirtschaftliche Ausbeute nicht gegeben, da große Mengen an Bulkchemikalien eingesetzt werden müssen. Hinzu kommt bei komplexen Molekülen die Eigenschaft, dass diese mehrere Stereozentren aufweisen, die durch Chromatographietechniken getrennt werden müssen. Dies zieht weitere Verluste der Ausbeute nach sich.

(2) Kultivierung der aus Schwammgewebe isolierten Mikroorganismen, die nachweislich die relevanten Wirkstoffe produzieren. Die Kultivierung der schwammassoziierten Mikroorganismen in Bioreaktoren scheint auf den ersten Blick eine Alternative darzustellen, aber es lassen sich beispielsweise nur 1 % der aus dem Gewebe von *A. aerophoba* isolierten Bakterien im Standard ZoBell-Medium kultivieren (Friedrich *et al.*, 2001).

(3) Deckung des Bedarfes durch das Ernten natürlicher Bestände. In vielen Fällen sind die natürlichen Bestände zu gering oder lokal begrenzt. Eine Nutzung

dieser Bestände hätte die Vernichtung natürlicher Populationen zur Folge. Aus Gründen der Nachhaltigkeit kommt diese Form der Schwammrohstoffgewinnung nur für die Grundlagenforschung und Untersuchung neuer Wirkstoffe in Frage.

(4) Kultivierung der Schwämme in Marikulturen. Die Vorteile sind die relativ geringen Kosten und eine ausreichende Versorgung der Schwämme mit allen lebensnotwendigen Nährstoffen. Nachteilig sind die unkalkulierbaren natürlichen Einflüsse wie Stürme, Temperaturen und Krankheiten.

(5) Kultivierung der Schwämme unter *ex-situ* Bedingungen. Der Vorteil sind die definierten und kontrollierbaren Bedingungen, Schwierigkeiten bereiten jedoch vor allem die Nahrungsversorgung und die Wasseraufbereitung.

3.2 Biologie der Schwämme

Zum ersten Mal wurden Schwämme von Aristoteles in seinen Aufzeichnungen erwähnt. Die Position der Schwämme im Ordnungssystem der Organismen war jedoch lange umstritten. Der Erlanger Naturforscher Eugen Johann Christoph Esper beschrieb die Schwämme in seinem Buch *Die Pflanzenthier in Abbildungen nach der Natur, mit Farben erleuchtet, nebst Beschreibungen*, 1791:

„Die meisten Naturforscher sind in der Bestimmung des Naturreichs dieses Geschlechts einig, es werden die Saugschwämme für wirkliche Pflanzen angenommen, wenigstens als sehr zweifelhaft unter die Körper von thierischen Organen, gerechnet“.

Im Jahre 1836 gab R. E. Grant dieser Tiergruppe den noch heute gültigen Namen Porifera, was so viel bedeutet wie „Poren tragend“ (lat. *porus* = Pore, *ferre* = tragen).

Ernst Haeckel ordnet bis 1868 die Schwämme den „Pflanzentieren“ zu. Erst 1896 stellt er die Schwämme, damals auch Spongien oder Schwammthiere genannt, aufgrund von ontogenetischen und histologischen Daten zu den echten Metazoen. Schwämme repräsentieren den Beginn der Evolution der Vielzeller, Fossilienfunde reichen bis ins Präkambrium zurück (Li *et al.* 1998; Reitner and Wörheide 2002).

Die systematische Einteilung der Porifera erfolgt überwiegend anhand der in den meisten Schwämmen vorhandenen mineralischen Skelettelementen, den Spicula und Skleren (Abbildung 3.2). In den Kieselschwämmen sind diese aus Kieselsäure aufgebaut, die in Kalkschwämmen bestehen aus Kalziumkarbonat.

Das Phylum Porifera umfasst über 15.000 Arten in drei taxonomischen Klassen: die Demospongia oder Hornschwämme, die Hexactinellida oder Glasschwämme und die Calcarea oder Kalkschwämme (Hooper and VanSoest, 2003 (2004)).

Die Klasse Demospongia stellt mit 95 % der rezenten Arten die größte Gruppe der Schwämme dar, mit über 7.000 Arten in 600 Gattungen, darunter drei Süßwassergattungen.

Einen Überblick über die phylogenetischen Zusammenhänge gibt Müller (1995).

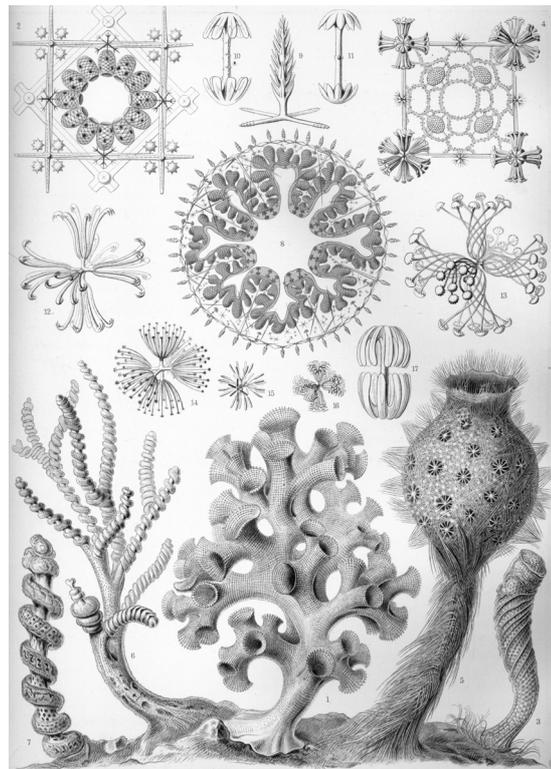


Abbildung 3.2: Hexactinellida Glasschwämme oder Kieselschwämme; (Haeckel, 1904).

3.3 Grundaufbau und Funktionsweise

Schwämme sind ursprüngliche Vielzeller, entsprechend einfach ist ihr Körperbau. Es finden sich keine Organe, Nerven- oder Muskelzellen, obwohl bei wenigen Schwammarten nicht-muskuläre Bewegungseffektoren zu beobachten sind (Nickel, 2004; Sidri *et al.*, 2004).

Schwämme können als einzigartiges Filtersystem betrachtet werden, bei dem der gesamte Körper für diese Funktion ausgelegt ist. Das Wasser fließt über zahlreiche, durch Porozyten geformte Einströmöffnungen, den Ostien, in das verzweigte Kanalsystem, welche in den Choanozytenkammern oder Kragengeißelkammern enden. Diese sind im Inneren des Schwammkörpers, dem Endosom oder Choaosom lokalisiert. Das Endosom wird gegen äußere Einflüsse durch das Pinacoderm, auch Cortex oder Ektosom genannt, abgeschlossen und geschützt (Sarà, 1971). Diese äußere Abschlusschicht wird aus flachen Zellen, den Pinacozyten, gebildet.

Im Inneren der Choanozytenkammern finden sich begeißelte Zellen, die sogenannten Choanozyten (Abbildung 3.3). Durch den Schlag ihres Flagellums wird eine gerichtete Wasserströmung erzeugt. Über das aquifere Kanalsystem gelangt das Wasser in den inneren Hohlraum, dem Atrium. Anschließend wird das Wasser über ein Osculum oder mehrere Oscula aus dem Schwamm ausgetrieben. Die Durchströmung versorgt den Schwamm nicht nur mit Nahrungspartikeln und Sauerstoff, sondern dient auch dem Abtransport der Abfallstoffe (Bergquist, 1978).

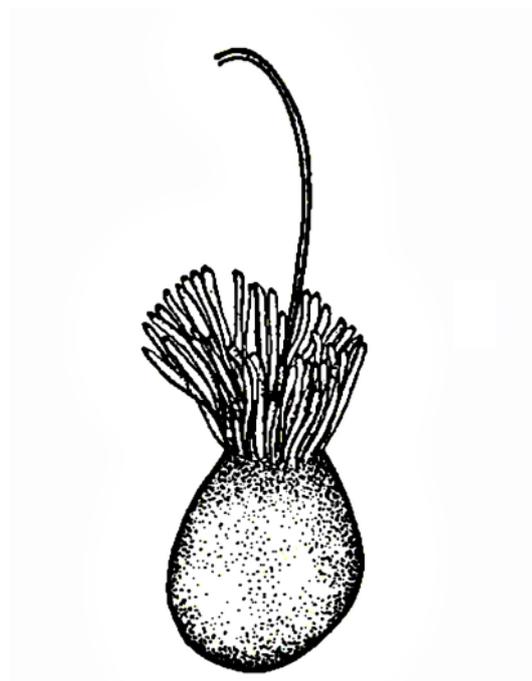


Abbildung 3.3: Choanozyte (Bergquist, 1978).

Die eingestrudelten Futterpartikel werden am Mikrovillikragen der Choanozyten zurückgehalten und phagozytiert. Zwischen dem Pinacoderm und den Choanoderm befindet sich eine gelatinöse Matrix, Mesohyl genannt. Es enthält bewegliche Zellen, so genannte Archaeocyten. Diese amöboiden Zellen transportieren die aufgenommenen Nahrungspartikel im Mesohyl zu den Orten des Bedarfs (Bergquist, 1978). Durch ihre omnipotenten Eigenschaften sind sie außerdem in der Lage, sich in Zellen mit anderen Funktionen umzudifferenzieren, wie zum Beispiel Sklerozyten die Spicula bilden, oder Spongozyten, welche Spongin bilden. Auf Grund der Mobilität dieser Zellen können manche Schwämme ihren Körper je nach Umweltbedingung mehr oder weniger stark umformen.

Nach Art und Komplexität des Kanalsystems unterscheiden sich drei Organisationstypen: der Ascontyp (Abbildung 3.4 a), der Sycontyp (Abbildung 3.4 b) und der Leucontyp (Abbildung 3.4 c). Die beiden einfacheren Körperformen sind bei Schwämmen eher selten und können auf Grund des schlechten Oberflächen-Volumenverhältnisses nur geringe Körpergrößen erreichen. Beim komplexeren Leucontyp (Abbildung 3.4 c) ist auf Grund der Morphologie eine deutlich größere innere Oberfläche vorhanden. Die zuführenden Kanäle münden in einem oder mehreren zentralen Oscula.

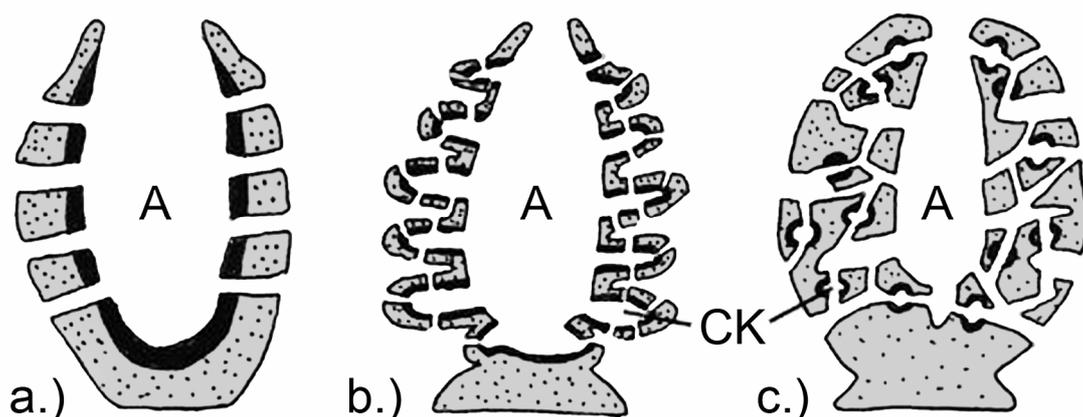


Abbildung 3.4: Organisationstypen der Schwämme Ascontyp (a), Sycontyp (b) und Leucontyp (c); A (Atrium), CK (Choanozytenkammern); (Wehner und Gering, 1995).

Die Fortpflanzung der Porifera kann sexuell oder asexuell erfolgen. Bei der sexuellen Fortpflanzung gehen die Eizellen aus somatischen Archaeozyten hervor, die Spermien vermutlich aus Choanozyten. Die meisten Schwämme sind Hermaphroditen. Sie besitzen sowohl weibliche als auch männliche Gonaden. Die Spermien werden in das Innere des Schwammes entlassen und mit dem Wasserstrom ausgestrudelt. Spermien von benachbarten Tieren werden wie Nahrungspartikel eingestrudelt, anschließend kommt es zur inneren Befruchtung. Entwickelte Larven werden ins Freie entlassen (Hentschel, 2003). Bei der asexuellen Vermehrung werden durch Knospung so genannte Gemmulae gebildet (Wehner und Gering, 1995). Diese Dauerstadien können Trocken- oder Kälteperioden überdauern.

3.4 Der Modellorganismus *Aplysina aerophoba*

3.4.1 Biologie

Ein Modellsystem sollte eine Anzahl typischer Eigenschaften repräsentieren, die charakteristisch für das Anwendungsgebiet sind, so dass die am Modell gewonnenen Ergebnisse stellvertretend dazu dienen können, allgemein gültig angewendet zu werden.

In dieser Arbeit wurde *A. aerophoba* als Modellorganismus ausgewählt, da er einige positive Eigenschaften besitzt. Bei *A. aerophoba* handelt es sich um eine häufige Schwammart im Mittelmeerraum und ist durch die Kooperation mit dem Institut Ruđer Bošković in Rovinj (Kroatien) gut verfügbar.

Sein Vorkommen ist auf niedrige Wassertiefen ab etwa einem bis 25 Meter beschränkt. Für Untersuchungen können sie mit Hilfe von Tauchern einfach gesammelt werden. Die ökologischen Anforderungen von *A. aerophoba* sind bekannt (Wilkinson and Vacelet, 1979) und ihre Naturstoffchemie ist bereits gut untersucht (Fattorusso *et al.*, 1972; Kreuter *et al.*, 1989; Kreuter *et al.*, 1990; Kreuter *et al.*, 1992; Teeyapant *et al.*, 1993; Koulman *et al.*, 1996).

Auch über die Zusammensetzung ihres Mikroorganismenspektrums sind bereits Untersuchungen durchgeführt worden (Hentschel *et al.*, 2001). Erste positive Erfahrungen in Aquarienkultur dieses nicht einfach zu kultivierenden Schwammes sind beschrieben (Hausmann *et al.*, 2006).

Die systematische Einordnung erfolgt nach Van Soest und Hooper (2002):

Stamm: Porifera (Grant 1836)
Klasse: Demospongiae (Sollas 1885)
Ordnung: Verongiida (Bergquist 1978)
Familie: Aplysinidae (Carter 1875)
Gattung: *Aplysina* (Nardo 1834)
Spezies: *Aplysina aerophoba* (Schmidt 1862)

Die Gattung *Aplysina* ist weltweit mit sieben Spezies vertreten. Hierzu zählen *A. aerophoba*, *A. archeri*, *A. cauliformis*, *A. cavernicola*, *A. fistularis*, *A. insularis*, und *A. thiona*. Zwischenzeitlich wurde die Gattung auch unter dem Namen *Verongia* (Bowerbank, 1845) geführt bis eine Einigung auf den Gattungsnamen *Aplysina* erfolgte (Bergquist, 1980). Im Deutschen wird er als Gold-, Schwefelschwamm oder Gelber Zylinderschwamm bezeichnet.

Die Gattung *Aplysina* ist hauptsächlich in tropischen Meeren vertreten, das Verbreitungsgebiet der Art *A. aerophoba* ist auf das Mittelmeer und einen kleinen Bereich der südeuropäischen Atlantikküste beschränkt (Van Soest und Hooper, 2002).

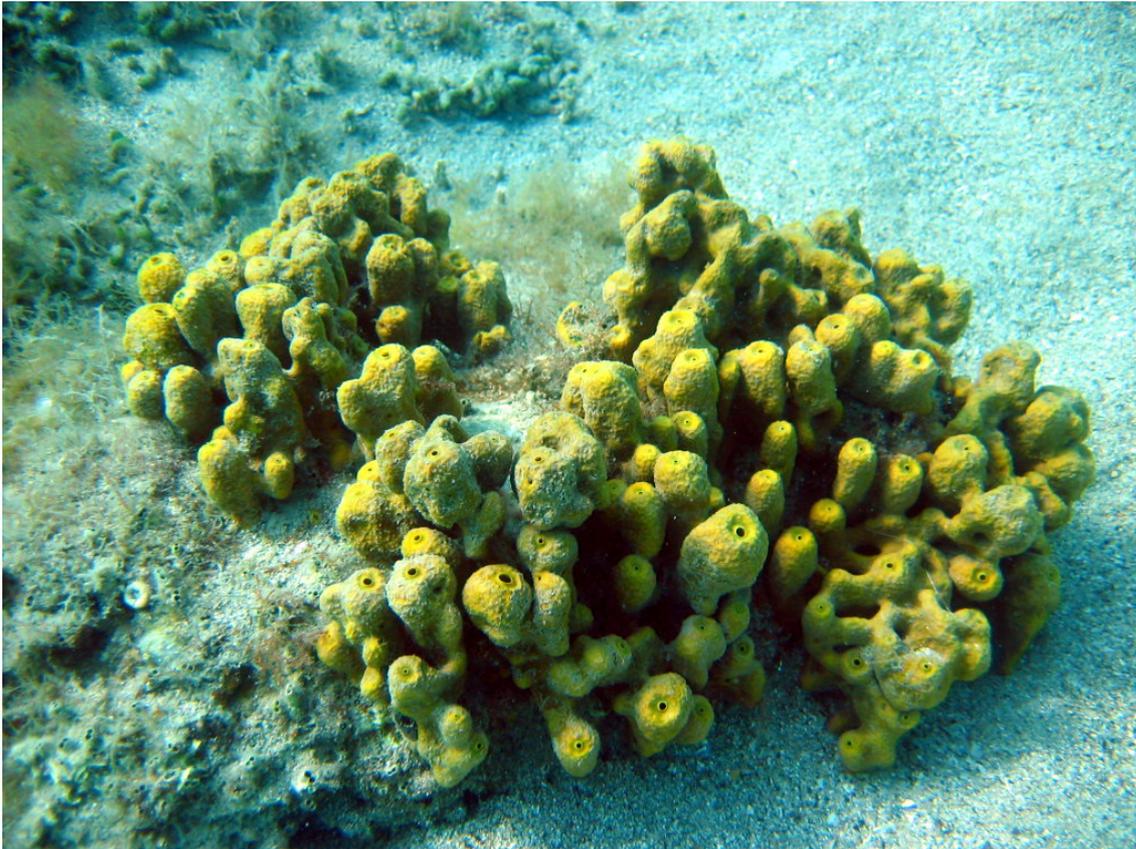


Abbildung 3.5: Aufnahme einer großen *Aplysina*-Kolonie im natürlichen Lebensraum vor der kroatischen Küste bei Rovinj.

Bei *A. aerophoba* handelt sich um einen häufig vorkommenden obligat photophilen Organismus. Er findet sich in lichtdurchfluteten Bereichen in Tiefen von einem (1) bis 20 Meter und kommt bevorzugt auf sedimentbedeckten Hartböden und zwischen Seegräsern vor. *Aplysina*-Schwämme bilden Kolonien aus zahlreichen aufrechten Schloten, die an der Basis verschmolzen sind. Die Grundfarbe von *A. aerophoba* ist leuchtend schwefelgelb und kann unterschiedliche rotbraune Tönungen aufweisen, welche durch assoziierte Cyanobakterien verursacht werden, die im ein bis zwei Millimeter dicken, äußeren Abschlussgewebe lokalisiert sind. Der Schwamm bildet fingerförmige Schlote aus, die einen Durchmesser von einem bis drei Zentimeter und Höhen zwischen drei und acht Zentimeter aufweisen. Am oberen Ende der Schlote findet sich in der Regel ein zentrales Osculum. Eine sehr detailgetreue Zeichnung von *Aplysina* ist in Abbildung 3.6 wiedergegeben.

Die Zeichnung 4 stellt den Habitus von *A. aerophoba* mit einem Längsschnitt durch das Schwammgewebe detailgetreu dar; die Zeichnung 6 skizziert den schematischen Aufbau mit zuführenden Kanälen, Choanozytenkammern. Der Wasserstrom durch den Schwamm ist durch Pfeile gekennzeichnet.

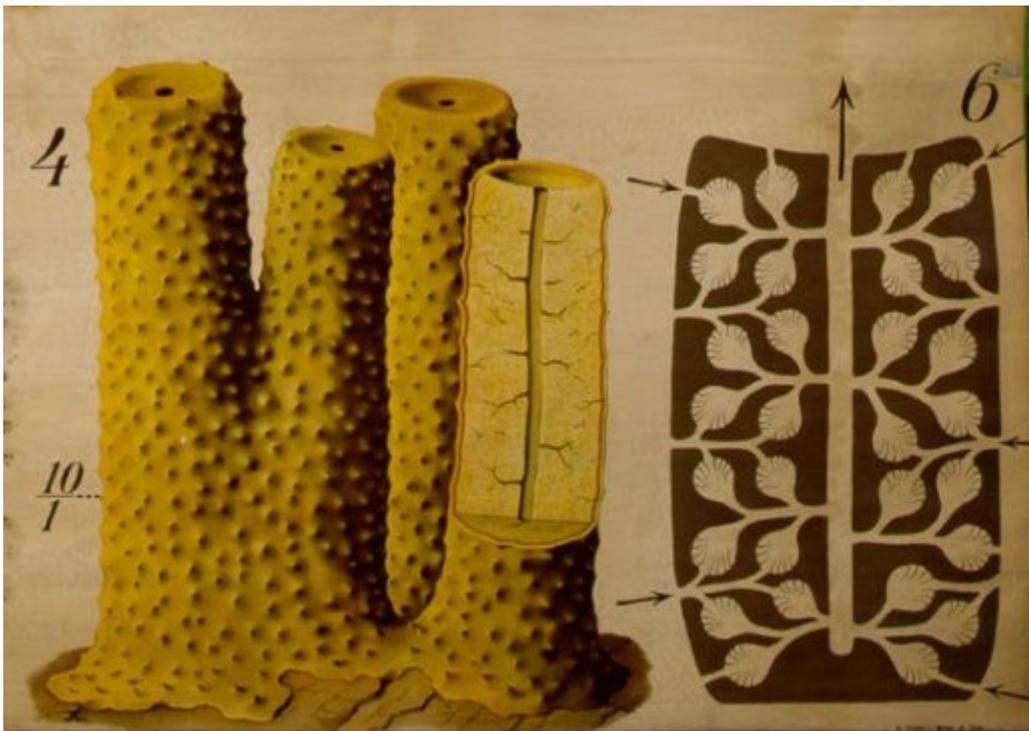


Abbildung 3.6: Ausschnitt aus Pfurtschellers Zoologische Wandtafel Nr. 12 - Darstellungen zum Bau von Schwämmen I. Quelle: Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie, Vergleichende Zoologie

Kolonien von *A. aerophoba* messen gewöhnlich zehn bis zwanzig Zentimeter im Durchmesser, selten erreichen große Kolonien Durchmesser über 60 Zentimeter. Ostien sind mit dem bloßen Auge nicht erkennbar. Der Schwammkörper enthält als Skelettelemente keine Spiculae, sondern verhornte Sponginfasern. Diese durchziehen das Schwammmesohyl und stützen das Schwammgewebe. Das Choanosom macht den Hauptteil des Schwammgewebes aus. Das Mesohyl beherbergt extrazellulär eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen, sie können bis zu 38 % der Schwammbiomasse ausmachen (Vacelet and Donadey, 1977; Hentschel *et al.*, 2001).

An Luft kommt es zu einer zuerst leicht grün-schwarzen, nach längerer Exposition blau-schwarzen Verfärbung (Schmidt, 1862). Diese Reaktion tritt auch bei mechanischen Verletzungen auf.

3.4.2 Naturstoffe in *Aplysina aerophoba*

Schwämme der Gattung *Aplysina* akkumulieren bromierte Isoxazolinalkaloide. Deren Gewebskonzentrationen können bis zu 12 % des Trockengewichtes erreichen (Teeyapant *et al.*, 1993). Die Abbildung 3.7 zeigt die 1972 von Ernesto Fattorusso aus *A. aerophoba* isolierte dibromierte Alkaloid-Komponente, Aeroplysinin-1. Diese Verbindung und sein Dienon zeigen antibakterielle Aktivität gegen gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus albus*, *Bacillus cereus*, und *B. subtilis* (Fattorusso *et al.*, 1972). Zusätzlich zeigt Aeroplysinin-1 cytostatische Aktivität gegen Tumorzellen, speziell Lymphoma und Epithelioma Zellen. Es unterbindet die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors bei Brustkrebszelllinien. Obwohl Aeroplysinin-1 im Handel erhältlich ist, wird es noch immer aus natürlichen Beständen von *A. aerophoba* gewonnen (Kreuter *et al.*, 1989; Kreuter *et al.*, 1990; Teeyapant *et al.*, 1993; Koulman *et al.*, 1996).

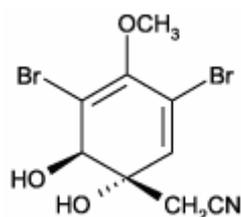


Abbildung 3.7: Aeroplysinin-1, aus *A. aerophoba* isolierte dibromierte Alkaloid-Komponente (Koulman *et al.*, 1996).

Diese Verbindung stellt einen Abkömmling des 3,5-Dibromtyrosins dar. Hauptkomponenten der Alkaloide sind Isofistularin-3 (4) und Aerophobin-2 (5), deren Freisetzungsmechanismus in Abbildung 3.8 dargestellt ist. Bei Verletzung des

Schwammgewebes werden inaktive Vorstufen zu Aeroplysinin-1 und dessen Dienon umgesetzt (Ebel *et al.*, 1997).

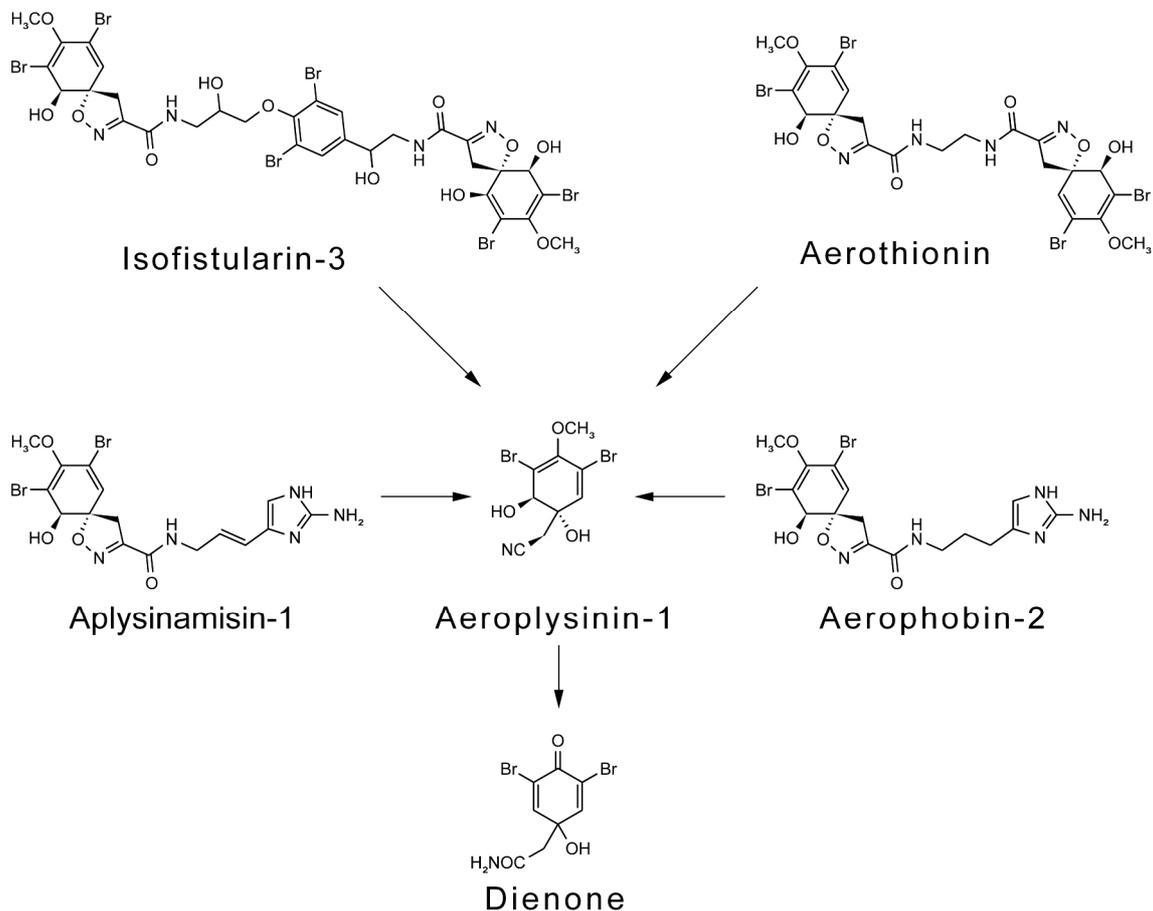


Abbildung 3.8: Biotransformation von bromierten Alkaloiden in *Aplysina*-Schwämmen (Teeyapant and Proksch, 1993).

Die Lokalisation des bioaktiven Aerothionin innerhalb so genannter sphärolöser Zellen bei *A. fistularis* deutet darauf hin, dass diese Komponenten durch den Schwamm selber und nicht durch assoziierte Mikroorganismen produziert werden (Thompson *et al.*, 1984; Turon *et al.*, 2000).

3.5 Physiologie

Als sessile Filtrierer sind Schwämme in der Lage, durch die Aktivität ihrer Choanozyten bis zum tausendfachen ihres Eigenvolumens pro Stunde durch ihr aquiferes Kanalsystem zu pumpen (Vogel, 1977; Ribes *et al.*, 1999b). Mit Ausnahme von phototrophen Schwämmen (Cheshire *et al.*, 1997), ernähren sich Schwämme heterotroph durch Partikelaufnahme aus der umgebenden Wassersäule. Die Partikelaufnahme ist hoch effektiv, aber im Wesentlichen unselektiv in einem gegebenen Partikelgrößenbereich (Kilian, 1952; Reiswig, 1971b; Wolfrath and Barthel, 1989).

Der von Schwämmen filtrierbare Partikelgrößenbereich liegt zwischen 0,2 μm und 50 μm (Reiswig, 1971b). Die Maximalgröße filtrierbarer Partikel um 50 μm ist rein mechanisch durch den Durchmesser der Ostia bestimmt. Die Partikelaufnahme selbst erfolgt nach zwei Mechanismen. Größere Partikel im Bereich zwischen 5 und 50 μm werden in den zuführenden Kanälen durch Phagozytose der diesen auskleidenden Zellen aufgenommen und an die Archaeozyten weitergegeben, die diese an die Orte des Bedarfes transportieren. Die kleineren Partikelfractionen bis 0,2 μm werden am Mikrovillikragen der Choanozyten zurückgehalten und anschließend durch diese phagozytiert (Jorgensen, 1966; Johnston and Hildemann, 1982).

Die wichtigsten Komponenten des Planktons für die Schwammernahrung sind aufgrund der Größeneinordnung das Pikoplankton (0,2 – 2 μm), das Nanoplankton (2 – 20 μm) und das Mikroplankton (20 – 200 μm). Plankton setzt sich aus verschiedenen heterotrophen Bakterien, Cyanobakterien sowie Nano- und Piko-eukaryoten zusammen (Reiswig, 1974a; Pile *et al.*, 1996; Pile, 1997; Ribes *et al.*, 1999a; Milanese *et al.*, 2003; Pile and Young, 2006). Neuere *in-situ* Untersuchungen von Yahel *et al.* (2003) haben gezeigt, dass Schwämme auch gelöstes organisches Material assimilieren können.

Schwämme haben gegenüber anderen filtrierenden Invertebraten Vorteile, da sie nicht nur große Wassermengen umsetzen können, sondern die enthaltenen Nahrungspartikel auch sehr effizient zurückhalten können. Dies ermöglicht die Besiedlung nährstoffarmer Lebensräume wie beispielsweise Korallenriffe. Dort

stellen sie die dominierende Gruppe an filtrierenden Organismen dar (Bergquist, 1978). Eine Zusammenstellung der in der Literatur zu findenden Filtrationsraten verschiedener mariner Schwämme zeigt die Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Übersicht veröffentlichter Filtrationsraten mariner Schwämme. Umgerechnet in Milliliter pro Sekunde und Milliliter Schwammvolumen. Angeordnet nach steigender Filtrationsrate.

Species	Literaturangaben Filtrationsrate	Filtrationsrate normalisiert auf $\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Quelle
<i>Verongia lacunosa</i>	1 – 6 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; Schwammvolumen 495 mL	0,005 – 0,034	Gerodette and Flechsig (1979)
<i>Haliclona permollis</i>	178 – 417 $\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0,049 – 0,116	Reiswig (1975)
<i>Verongia fistularis</i>	2,94 – 16,75 $\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	0,049 – 0,276	Reiswig (1981)
<i>Verongia gigantea</i>	0,05 – 0,10 $\text{cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	0,05 – 0,10	Reiswig (1974b)
<i>Sphaciospongia vesperia</i>		0,069	Lynch and Philips (2000)
<i>Halichondria melanadocia</i>		0,080	Lynch and Philips (2000)
<i>Haliclona permollis</i>	0,314 $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$; Schwammvolumen 2,4 mL	0,131	Reiswig (1975)
<i>Tethya crypta</i>	0,18 $\text{cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	0,18	Reiswig (1974b)
<i>Mycale</i> sp.	0,21 – 0,27 $\text{cm}^3\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	0,21 – 0,27	Reiswig (1974b)
<i>Biemna</i> spp.		0,221	Lynch and Philips (2000)
<i>Halichondria bowerbank</i>		0,24	Vogel (1974)
<i>Halichondria panicea</i>	0,37 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FG; Schwammgewicht 0,15 g	1,03	Jorgensen (1966)
<i>Grantia compressa</i>	0,64 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FG; Schwammgewicht 0,15 g	1,78	Jorgensen (1966)

modifiziert nach (Lynch, 2000).

Für den mediterranen Schwamm *Chondrilla nucula* wurden Rückhalteraten für eine Koloniefäche von einem Quadratmeter bestimmt. Dabei wurden 14 Liter Seewasser pro Stunde von der Schwammbiomasse prozessiert und diesem pro Stunde $7 \cdot 10^{10}$ Bakterien entzogen (Milanese *et al.*, 2003). Die Versuche wurden unter Laborbedingungen in künstlichem Seewasser bei 16 ° bis 20 °C mit *E. coli* als Futterpartikel durchgeführt.

Für *A. lacunosa*, *Callyspongia vaginalis* und *Niphates digitalis*, drei Schwämme aus der Klasse der Demospongia die eine Größe von bis zu zwei Meter erreichen können, wurden Rückhalteraten in einem Korallenriff der Florida Keys mittels zweier Methoden (Coulter Counter und plate cultur analysis) bestimmt (Duckworth *et al.*, 2006). Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass Rückhalteraten für Partikel im Größenbereich von 0,75 - 18 µm bei allen drei Spezies vergleichbar waren. Die bestimmten Werte bei den beiden verwendeten Methoden lagen bei über 80 % (86 % beim Coulter Counter und 82 % bei der Ausplattierungsmethode). Für die verschiedenen Partikelgrößenbereiche zeigte sich eine Abnahme der Rückhalteraten mit ansteigender Partikelgröße (87 % für den Größenbereich von 0,75 – 2 µm, 64 % für den Größenbereich von 2 – 5 µm und 41 % für den Größenbereich von 5 – 18 µm).

In anderen Studien wurden Rückhalteraten von 70 % bis 99 % für kleinste suspendierte Partikel ermittelt (Reiswig, 1971b; Pile *et al.*, 1996; Ribes *et al.*, 1999b). Untersuchungen von Henry Reiswig von der Yale University (USA) zur Filtereffektivität von tropischen Demospongiae in der Discovery Bay vor Jamaika zeigten, dass mehr als 96 % der bakteriellen Zellen aus dem umgebenden Wasser zurückgehalten werden. Bei steigender Partikelgröße sanken die Rückhalteraten. Bei Phytoplankton betragen die Rückhalteraten 86,5 %, für so genannte „Armored cells“, zu denen Dinoflagellaten, Diatomeen und Pilzsporen gehören, wurden nur noch Rückhalteraten um 48,7 % ermittelt. Noch niedrigere Rückhalteraten wurden für Detritus mit 41,9 % und gelöste organische Bestandteile mit 35,1 % bestimmt (Reiswig, 1971b).

Von Adele Pile konnte mit neueren Methoden wie der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die Rückhalteraten des atlantischen Schwammes *Mycale lingua* für unterschiedliche Planktontypen kleiner 10 µm nicht größenabhängig,

sondern zelltypenabhängig variieren. Die besten Rückhalteraten mit 93 % wurden für kleine Futterpartikel wie *Prochlorococcus*-ähnliche Cyanobakterien ermittelt, jedoch nur 72 % für die kleinsten photosynthetischen Eukaryoten (Pile *et al.*, 1996; Pile, 1997).

Ähnliche Methoden wurden angewendet um für den vor Neuseeland vorkommenden Schwamm *Polymastia croceus* die Rückhalteraten für verschiedene Futterpartikel zu bestimmen. Für *Synechococcus*-typische Cyanobakterien lagen diese bei 94 %, für Pikoekaryoten bei 88 %, für *Prochlorococcus*-ähnliche Cyanobakterien und andere heterotrophe Bakterien bei 74 % und 46 % (Bell *et al.*, 1999). Die niedrigeren Rückhalteraten mancher Zelltypen, auch kleinerer Partikel, lassen vermuten, dass es im Gegensatz zu den Ergebnissen von Reiswig und Pile, auch eine selektive Nahrungsaufnahme bei Schwämmen geben könnte.

Neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Hentschel stützen diese Hypothese. Diese zeigten für *A. aerophoba*, dass ein Konsortium aus Bakterien des umgebenden Seewassers im Vergleich zu symbiotischen Bakterien des Schwammes besser zurückgehalten wurden (Wehrl *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass diese symbiotischen Bakterien durch die Existenz von Schleimhüllen, wie sie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Vacelet und Donaday (1977) nachgewiesen wurden, vor dem Verdauungsprozess durch die Schwammzellen geschützt sind.

3.6 Komposition der organischen Substanzen im marinen Lebensraum

Der gesamte organische Kohlenstoff (TOC – total organic carbon) in aquatischen Habitaten wird üblicherweise in zwei Fraktionen geteilt: den gelösten organischen Kohlenstoff (DOC – dissolved organic carbon) und den partikulären organischen Kohlenstoff (POC – particulate organic carbon). Definitionsgemäß wird die Fraktion, welche einen 0,45 µm Filter passiert, als DOC bezeichnet.

Der POC setzt sich aus suspendierten Partikeln wie Bakterien und Detritus zusammen und wird rechnerisch aus der Differenz von TOC und DOC ermittelt.

Die absoluten Werte für den TOC in marinen Habitaten liegen in der Größenordnung von einem Milligramm Kohlenstoff pro Liter (Yahel *et al.*, 2003). Der größte Teil des TOC (> 90 %) liegt in gelöster Form vor, aber nur ein geringer Teil dieses DOC ist biologischen Prozessen zugänglich. Der größte Teil ist somit refraktär und für die marinen Organismen nicht verfügbar (Carlson, 2002).

Eine Übersicht der biochemischen Zusammensetzung der pico-, nano- und mikropartikulären organischen Substanzen und der Biomasse des Bakterioplanktons im nordöstlichen Mittelmeer vor Kreta gibt Danovaro *et al.* (2000).

Adele Pile (1997) hat mittels Durchflusszytometrie (dual beam flow cytometrie) die Zellzahlen bis 10 µm Größe im Golf von Mexiko untersucht. Die Berechnung der Kohlenstoffgehalte für die einzelnen Gruppen erfolgte nach Ducklow *et al.* (1993) für heterotrophe Bakterien (20 fg C / Zelle), 53 fg C / Zelle für *Prochlorococcus* (Morel *et al.*, 1993), 470 fg C / Zelle für *Synechococcus*-ähnliche Cyanobakterien (Campbell *et al.*, 1994). Die Werte für Eukaryoten ergeben sich nach der Formel von Verity *et al.* (1992) wobei die geometrisch ähnlichste Form für die Berechnung des Biovolumens zugrunde gelegt wurde.

$$\text{pg C} = 0,433 \cdot \text{Biovolumen (mL)}^{0,866}$$

Die durchschnittlichen Zellvolumina und die daraus berechneten Kohlenstoffäquivalente für verschiedene Planktontypen bis zu einer Größe von 10 µm sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Summe des den Schwämmen zur Verfügung stehenden Kohlenstoffs aus dem POC bis 10 µm liegt in der Größenordnung von 70 µg Kohlenstoff pro Liter Meerwasser.

Tabelle 3.2: Anteile des marinen Pico-, und Nanoplankton bis 10 μm und ihr berechnetes Kohlenstoffäquivalent.

Plankontyp	Zellen mL^{-1}	Prozentualer Anteil an den Zellzahlen	$\mu\text{g C L}^{-1}$	Prozentualer Anteil des POC
Heterotrophe Bakterien	$3,05 \cdot 10^5$	63	6,10	9
<i>Prochlorococcus</i>	$6,62 \cdot 10^4$	14	3,51	5
Cyanobakterien	$1,10 \cdot 10^5$	22	51,80	78
Picoeukaryoten	$1,13 \cdot 10^3$	<1	4,84	7
Nanoeukaryoten	$9,90 \cdot 10^2$	<1	2,57	38

nach Pile *et al.* (1996)

Die Ergebnisse von Adele Pile zeigten, dass heterotrophe Bakterien bezogen auf die Zellzahlen von $3,05 \cdot 10^5$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ die dominierende Nahrungsquelle der Schwämme darstellen, gefolgt von Cyanobakterien, *Prochlorococcus*, Pico- und Nanoeukaryoten. Eine bessere Beurteilung der zur Verfügung stehenden Futtermenge ist jedoch die Ermittlung der Kohlenstoffäquivalente eines jeden Zelltypus. Betrachtet man die Kohlenstoffäquivalente, so stellen die Cyanobakterien mit 78 % den Hauptanteil der Energieträger. Pico- und Nanoeukaryoten liegen, bezogen auf die Zellzahlen, zwei Zehnerpotenzen unter denen der Bakterien. Der durch die beiden Nahrungsquellen zur Verfügung stehende Kohlenstoff liegt jedoch in der gleichen Größenordnung.

3.7 Wachstum von Schwämmen

Schwämme können eine Größe von bis zu zwei Metern erreichen, wie beispielsweise der karibische Vasenschwamm *Xestospongia muta* (Schmidt, 1870). Sie können zudem ein beachtliches Alter erlangen, wie der in der Antarktis entdeckte Glasschwamm *Scolymastra joubini* (Topsent, 1916). Sein Alter wird auf 10.000 Jahre geschätzt. Er wäre somit das älteste lebende Tier. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Schwämme ist sehr gering, eine Verdopplung der Biomasse dauert in der Regel Monate bis Jahre, während der kommerziell genutzte Badeschwamm *Spongia officinalis* seine Biomasse innerhalb eines Jahres verdoppeln kann.

Im Gegensatz zu den meisten Lebewesen, deren Wachstum bis zur endgültigen Größe asymptotisch zunimmt, zeigen Schwämme ein so genanntes unbestimmtes Größenwachstum. Dies bedeutet, dass ihre Schwamm biomasse zunehmen, aber unter ungünstigen Bedingungen auch abnehmen kann, ohne dass es zum Absterben der Schwammkolonie führen muss (Turon *et al.*, 1998). Die Forschungsergebnisse von Turon *et al.* (1998) am inkrustierend wachsenden Mittelmeerschwamm *Crambe crambe* zeigten, dass innerhalb des Untersuchungszeitraumes von zwei Jahren eine mittlere Zunahme um den Faktor 2 - 5 festzustellen war. Es konnte eine saisonale Abhängigkeit der Zu- und Abnahme der Biomasse beobachtet werden. Der ursächliche Zusammenhang scheint die saisonal schwankende Partikelmenge darzustellen. Eine Biomassezunahme war nur von Mai bis Oktober zu messen. Die besondere Fähigkeit der Schwämme auf das entsprechende Nahrungsangebot mit einem Zuwachs oder einem Reduzieren der Biomasse zu reagieren wird als undeterminiertes Wachstum bezeichnet. Außerdem wurden höhere Wachstumsraten in gut durchleuchteten Bereichen festgestellt.

Für *A. aerophoba* wurden von Wilkinson und Vacelet (1979) unter Freilandbedingungen nahe Marseille Volumenzunahmen bis 80 % innerhalb von 47 Wochen beschrieben. Allgemein sind die zu beobachtenden Wachstumsraten sowohl stark von der untersuchten Art, als auch von den Umwelt-, bzw. Kulturbedingungen abhängig. Ursache sind saisonale Schwankungen der Temperatur und Lichteinstrahlung als auch an der dadurch veränderten Zusammensetzung der Futtermenge und deren Qualität. Untersuchungen von Frost und Williamson (1980) beobachteten, dass bei Anwesenheit symbiotischer Algen die Biomassezunahme bei Schwämmen erhöht war.

Für *A. aerophoba* mit erheblichen Mengen an symbiotischen Cyanobakterien konnte gezeigt werden, dass ihr Wachstum im Licht erhöht war, besonders dann, wenn eine Sedimentation der Schwammoberfläche und eine Verstopfung der zuführenden Kanäle ausgeschlossen war (Wilkinson and Vacelet, 1979). Im Gegensatz zu anderen Schwämmen des gleichen Habitats wie z.B. *Chondrosia reniformis* ist *A. aerophoba* nicht in der Lage, seine Oberfläche durch Absonderung von Mucus zu reinigen.

Die an verschiedenen Schwammspezies untersuchten Wachstumsraten werden meistens als Zunahme des aschefreien Trockengewichtes (AFDW) beschrieben (Barthel and Theede, 1986) oder als prozentuale Zunahme der Schwammbiomasse (Elvin, 1976; Frost and Williamson, 1980; Osinga *et al.*, 1999). Für inkrustierende Schwämme ist die Flächenbestimmung die Methode der Wahl (Fell and Lewandrowski, 1981; Ayling, 1983; Turon *et al.*, 1998).

In Marikulturen vor Neuseeland wurden die beiden Demospongiae *Latrunculia wellingtonensis* (Alvarez, Bergquist und Battershill) and *Polymastia croceus* (Kelly-Borges und Bergquist) für neun Monate *in-situ* an Schnüren bzw. Gitterstrukturen kultiviert. Beide Arten zeigten bei Temperaturzunahme Wachstum, schrumpften aber bei niedrigeren Temperaturen. Die größten Wachstumsraten wurden in den Gebieten mit den höchsten Strömungsgeschwindigkeiten von $0,19 - 46 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ erreicht. Sie betragen bis zu 960 % bzw. 730 % des Ausgangsvolumen innerhalb des Untersuchungszeitraumes von sechs Monaten (Duckworth and Battershill, 2003; Duckworth *et al.*, 2004).

3.8 Assoziierte Mikroorganismen

Die meisten marinen Invertebraten beherbergen Mikroorganismen wie Bakterien, Cyanobakterien, Algen und Pilze in ihrem Gewebe. Bei Schwämmen finden sich diese im extrazellulären und intrazellulären Raum (Vacelet and Donadey, 1977; Wilkinson, 1992). Man unterscheidet zwischen extrazellulärer Exosymbiose, extrazellulärer Endosymbiose, intrazellulärer Symbiose und intranukleärer Symbiose. Die Lokalisation der symbiotischen Mikroorganismen ist in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt.

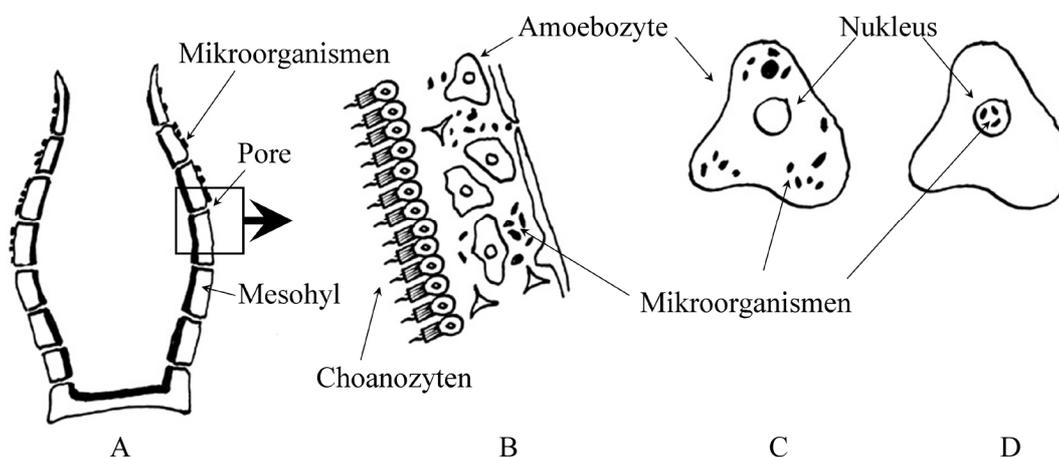


Abbildung 3.9: A, Extrazelluläre Exosymbiose; B, Extrazelluläre Endosymbiose; C, Intrazelluläre Symbiose; und D, Intranukleäre Symbiose.

Bei *A. aerophoba* beträgt der Anteil an Mikroorganismen bis zu 40 % der Biomasse (Friedrich *et al.*, 1999). Die Konzentrationen der Mikroorganismen liegen damit um 2 - 3 Zehnerpotenzen über denen des umgebenden Meerwassers. Die Zusammensetzung der einzelnen Mikroorganismenspezies ändert sich auch unter Hungerbedingungen und Antibiotikabehandlung nicht wesentlich (Friedrich *et al.*, 2001).

Die Interaktionen von Schwämmen mit Bakterien und anderen Mikroorganismen sind komplex und können von rein trophischen Beziehungen bis hin zu stabilen Lebensgemeinschaften reichen. Die Oberflächen und Zwischenräume von mari-

nen Schwämmen sind wesentlich nährstoffreicher als das umgebende Seewasser und bieten den Vorteil eines sichereren Lebensraumes und partizipieren am chemischen Verteidigungssystem gegenüber Räubern und Biofouling (Proksch, 1994). Im Gegenzug unterstützen die Mikroorganismen den Ernährungsprozess des Wirtes beispielsweise durch Stickstofffixierung, Nitrifikation oder Photosynthese (Wilkinson and Fay, 1979).

Für *A. aerophoba* wurden nitrifizierende Bakterien nachgewiesen (Bayer *et al.*, 2008). Zur Analyse der möglichen Stoffflüsse zwischen dem Wirtschwamm und den assoziierten Bakterien wurden die Veränderungen der Isotopenverhältnisse ($\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{13}\text{C}$) untersucht. Die erhöhten $\delta^{15}\text{N}$ -Werte in der äußeren Rindenschicht (Pinacoderm) deuten auf den Prozess der Stickstofffixierung hin die durch das Vorhandensein von Cyanobakterien erklärbar ist. Geringe Unterschiede in den Isotopenverhältnissen zwischen der Bakterienfraktion und dem Schwammgewebe weisen auf umfangreiche metabolische Wechselwirkungen zwischen den beiden Symbiosepartnern hin. Darüber hinaus wurden physiologische Experimente an ganzen Schwämmen und isolierten Schwammbakterien durchgeführt. Nach Inkubation von *A. aerophoba* in Ammonium wurde das Stoffwechselendprodukt Nitrat ausgeschieden, im Gegensatz dazu zeigten die natürlich bakterienfreien Kontroll-Schwämme *Acanthella acuta* und *Crambe crambe* keine Nitratexkretion nach Inkubation in ammoniumhaltigen Wasser. Diese Ergebnisse deuten auf eine bakterielle Nitrifikation im Schwamm *A. aerophoba* hin.

Aus schwammassoziierten Bakterien wurden antimikrobielle Substanzen isoliert, die die Vermutung stützen, dass diese Bakterien alleinige Produzenten der chemischen Abwehr sind oder zumindest Vorstufen der Synthese für den Schwamm liefern (Bultel-Ponce *et al.*, 1999). Einige beschriebenen Naturstoffe aus Schwämmen sind eindeutig mikrobieller Herkunft (Faulkner *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2000). Metaboliten mit antibakterieller (Unson *et al.*, 1994), antifungaler (Schmidt *et al.*, 2000), cytotoxischer (Bewley *et al.*, 1996) und fraßhemmenden (Unson and Faulkner, 1993) Wirkungen sind auf symbiotische Bakterien in Schwämmen zurückzuführen. Dies deutet darauf hin, dass der mikro-

bielle Sekundärstoffwechsel eine wichtige Rolle für die Abwehrmechanismen der Schwämme als auch deren Erfolge im evolutiven Prozess einnimmt.

Eine große Anzahl mariner Schwämme beherbergt Cyanobakterien als autotrophe Symbionten. Für *Chondrilla australiensis* konnte die Transmission von intakten Cyanobakterien gezeigt werden (Usher *et al.*, 2001). Die Cyanobakterien können ihrem Wirt als Nahrung sowohl durch extrazelluläre Lyse als auch durch Phagozytose dienen (Sarà 1971, Wilkinson, 1978a, b). Hauptsächlich scheinen jedoch die Cyanobakterien die Schwammzellen mit reduzierten Kohlenstoffverbindungen beispielsweise in Form von Glycogen zu versorgen (Vacclet, 1971). Ein grundlegendes Verständnis der Stoffwechselzusammenhänge zwischen Symbionten und Schwamm lieferten die Untersuchungen von Wilkinson und Fay (1979). Er konnte nachweisen, dass die Cyanobakterien Glycerin und kleine organische Phosphate an das umgebende Schwammgewebe abgeben. Derivate dieser Verbindungen sind bekannte Moleküle zentraler Stoffwechselvorgänge.

Zusätzlich versorgen sie ihren Wirt mit fixiertem Kohlenstoff oder mit Stickstoffverbindungen (Wilkinson and Fay, 1979). Im Gegensatz dazu bieten die Schwämme Besiedlungsraum und Schutz (Wilkinson and Fay, 1979; Sarà *et al.*, 1998). Die gesamte Biomasse photosynthetischer Cyanobakterien in Schwämmen kann in Einzelfällen annähernd der Menge an Schwammzellen entsprechen und bis zu 50 % des Kohlenstoffbedarfs eines Schwammes decken. Beispielsweise kann bis zu 80 % des Kohlenstoffbedarfes des Schwammes *Phyllospongia lamellosa* durch die Photosyntheseleistung der photosynthetischen Mikroorganismen gedeckt werden (Wilkinson, 1983; Cheshire *et al.*, 1997).

Biochemische Analysen der symbiotischen Stoffwechselprodukte zwischen Cyanobakterien und zweier mediterraner Demospongia, *Chondrilla nucula* (Schmidt) und *Petrosia ficiformis* (Poiret) zeigten, dass bei Abdunkelung der Schwämme *P. ficiformis* ohne die Unterstützung der energiereichen Verbindungen der photosynthetischen Symbionten sein Massenbilanz decken kann. Im Gegensatz dazu zeigte *C. nucula* eine schrittweise Biomasseabnahme (Arillo *et al.*, 1993). Dies deutet darauf hin, dass die Zusammenhänge zwischen Symbiont und Schwamm komplexer sind, als ein einfacher Nährstoffübergang. Das Fehlen bzw. die Inak-

tivität der Cyanobakterien führt bei *C. nucula* zu einer Stoffwechselveränderung, die durch eine Abnahme des RNA:DNA Verhältnisses gekennzeichnet ist. Außerdem ist eine Abnahme der Zucker und Glykogen um ca. 50 % festgestellt worden. Letztlich sinkt auch die Dehydrogenaseaktivität und es besteht eine klare Reduzierung der Mercaptogruppen. Dadurch sinken die Reduktionsäquivalente, es kommt zu einer Oxidation der Lipide, deren Synthese NADPH-abhängig ist. Dies erklärt die Verbreitung der beiden Schwammarten im natürlichen Lebensraum, *P. ficiformis* kommt sowohl in lichtdurchfluteten Bereichen als pigmentierte Form vor, als auch unter kryptischen Bedingungen in blasser Ausprägung. Im Gegensatz dazu findet sich *C. nucula* nur in lichtdurchfluteten Bereichen.

Symbiosen zwischen Flachwasserschwämmen und photosynthetischen Organismen sind sowohl in tropischen als auch subtropischen Meeren weit verbreitet, die, ähnlich wie die Zooxanthellen der Korallen, ihrem Wirt organische Substanzen liefern (Van Soest, 1996). Zwar bestehen noch viele Unklarheiten über die Vorzüge für die einzelnen Partner, doch Studien von Vacelet und Wilkinson bestätigen, dass Schwämme von den assoziierten Cyanobakterien oder Algen photosynthetisch produzierte energiereiche Stoffwechselprodukte aufnehmen (Vacelet, 1971; Wilkinson and Fay, 1979; Wilkinson, 1983). Im Gegenzug nutzen die Algen und Cyanobakterien die von den Schwämmen produzierten Stoffwechselprodukte wie beispielsweise Ammonium. Außerdem finden sie im Schwammgewebe einen vor Fraßfeinden geschützten Lebensraum vor (Price *et al.*, 1984). Die am meisten verbreiteten assoziierten photosynthetischen Organismen sind kleine ($< 3 \mu\text{m}$), ovoide *Chroococcales*, welche von Feldmann 1933 bei der Gattung *Ircinia* und *Petrosia* gefunden und als *Aphanocapsa feldmanni* beschrieben wurden. Sie finden sich Schwämmen sowohl in der Karibik (Rützler, 1985), als auch im Mittelmeer (Sarà, 1971; Vacelet, 1971) und im Pazifik (Wilkinson, 1978 a,b) immer in den gleichen Familien oder Stämmen wie z.B. *Chondrilla*, *Ircinia*, *Aplysina*, *Petrosia*, *Calyx*, *Cribochalina*, *Xestospongia* und *Neofibularia*.

Viele Schwämme gewinnen ihre Nährstoffe über Phagozytose und Verdau ihrer mikrobiellen Symbionten (Maldonado and Young, 1998). Außerdem scheinen die symbiotischen Cyanobakterien an der Produktion der aus Schwämmen iso-

lierten Sekundärmetaboliten beteiligt zu sein (Unson *et al.*, 1994; Flowers *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2000). Diese Stoffe können eine Reihe von ökologischen Funktionen erfüllen. Dazu gehören die Abwehr von Fraßfeinden und die Abwehr von konkurrierenden Schwammarten (Thacker *et al.*, 1998; Engel and Pawlik, 2005). Außerdem schützen sie die Schwämme vor mikrobiellen Infektionen (Thakur *et al.*, 2003).

Zwei hauptsächlich vorkommende symbiotische Cyanobakterien wurden für drei Arten mariner Schwämme der Familie *Dysideidae* beschrieben: filamentöse *Oscillatoria spongelliae* und einzellige *Synechococcus* sp. (Larkum *et al.*, 1987; Hinde *et al.*, 1994; Thacker and Starnes, 2003). Symbiotische *Synechococcus*-Arten werden für zahlreiche Schwämme beschrieben, einschließlich *Xestospongia muta* (Petrosiidae, Haplosclerida; Gomez *et al.*, 2002), *A. aerophoba* (Aplysinidae, Verongida; Hentschel *et al.*, 2002.), und *Chondrilla nucula* (Chondrillidae, Chondrosida; Usher *et al.*, 2004b). Schwammassoziierte *Synechococcus*-Arten unterscheiden sich genetisch von planktonischen *Synechococcus*-Arten, es besteht aber kein Anhaltspunkt, dass diese Symbionten wirtsspezifisch auftreten (Usher *et al.*, 2004a). Der Wirkung der Cyanobakterienphotosynthese auf den Stoffwechsel von Schwämmen konnte durch Abschattungsversuche beeinflusst werden (Sarà *et al.*, 1998; Gomez *et al.*, 2002).

Robert W. Thacker untersuchte bei *Lamellodysidea chlorea* and *Xestospongia exigua* die Wirkung der Abschattung, um zu testen, ob Schwämme mit Cyanobakterien als Symbionten auf reduzierte Lichteinstrahlung ansprechen. Wenn der Symbiont den Wirtsschwamm unterstützt, sollte eine Reduktion der Stoffwechselleistung zu erwarten sein, welche bei starker Abhängigkeit auch zu einem Biomasseverlust führen muss (Thacker, 2005).

Zudem wird diskutiert, welche Rolle die assoziierten Mikroorganismen bei der Synthese der Sekundärmetabolite spielen. Die genauen Zusammenhänge dieser Symbiosegemeinschaften sind bis heute nicht klar. So stellt sich die Frage, ob ein assoziierter Mikroorganismus wirklich ein Symbiont im herkömmlichen Sinne ist und spezifisch und kontinuierlich im Wirtsorganismus vorkommt, oder ob der Schwamm nur einen besonderen Lebensraum für den jeweiligen Mikroorganis-

mus darstellt, der die Synthese spezieller Sekundärmetabolite induziert (Hentschel *et al.*, 2001).

3.9 Respirationsraten

Die in der Literatur angegebenen Respirationsraten bei Schwämmen schwanken und sind zum einen von der Umgebungstemperatur (Coma *et al.*, 2002) als auch von der untersuchten Schwammspezies abhängig. Die in der Literatur zu findenden Werte für Respirationsraten für verschiedene Schwammspezies liegen in der Größenordnung von 0,31 bis 1,13 $\text{mg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{DM} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. 0,93 bis 2,63 $\text{mg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{AFDM} \cdot \text{h}^{-1}$. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die in der Literatur angegebenen Respirationsraten für verschiedene Schwammarten.

Wie zu erwarten nehmen die Respirationsraten mit steigender Temperatur zu. Die Sauerstoffverbrauchsrate bakterienhaltiger Schwämme sind im Gegensatz zu Schwämmen mit einer geringen Menge an assoziierten Mikroorganismen höher.

Untersuchungen der Sauerstoffverbrauchsrate an drei marinen sessilen Filtrierern, dem Schwamm *Dysidea avara*, der Ascidie *Halocynthia papillosa* und der Gorgonie *Paramuricea clavata* zeigten Schwankungen bei den einzelnen Individuen um den Faktor zwei bis drei. Zusätzlich wurde ein ausgeprägtes saisonales Muster beobachtet, tageszeitliche Rhythmen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit von der Temperatur konnte nur bei den beiden aktiven Filtrierern beobachtet werden. Die zu den passiven Filtrierern gehörende Gorgonie zeigte diesen Zusammenhang nicht (Coma *et al.*, 2002).

Tabelle 3.3: Zusammenstellung von Respirationsraten verschiedener Schwämme aus der Familie der Demospongia, nach Veröffentlichungszeit geordnet.

	mL O ₂ g ⁻¹ WW h ⁻¹	mL O ₂ mL ⁻¹ WW h ⁻¹	mg O ₂ g ⁻¹ DM h ⁻¹	mg O ₂ g ⁻¹ AFDM h ⁻¹	Quelle
<i>Haliclona rubens</i>		0,55 (Dun- kel) - 0,15 (Licht)			De Laubenfels (1932)
<i>Iotrochata birotulata</i>		0,67 (Dun- kel) - 0,154 (Licht)			De Laubenfels (1932)
<i>Ephydati fluviatilis</i>		0,043			Kilian (1952)
<i>Suberites carno- sus</i>			1,13		Cotter (1978)
<i>Spongilla la- custris</i>			0,97		Karchenko and Lyashenko (1986)
<i>Halichondria panicea</i>				0,97	Barthel (1988)
<i>H. panicea</i>			0,90	2,36	Thomassen and Riisgard (1995)
<i>Mycale sp.</i>	0,126	0,0444		2,13	Reiswig (1974b)
<i>Verongia gigantea</i>	0,1004	0,0628		1,54	Reiswig (1974b)
<i>Tethya crypta</i>	0,0329	0,0154		0,63	Reiswig (1974b)
<i>Thenea abyssos- rum</i>				0,71+/-0,23	Witte and Graf (1996)
<i>Thenea muricata</i>				0,60+/-0,36	Witte and Graf (1996)
<i>Tetilla cranium</i>				0,60+/-0,10	Witte and Graf (1996)
<i>Mycale acerata</i>				0,126	Kowalke (2000)
<i>Isodictya kerguelensis</i>				0,05	Kowalke (2000)
<i>Dysidea avara</i>			0,31+/- 0,13	0,93+/-0,36	Coma <i>et al</i> (2002)

Mittelwert +/- Standardabweichung

3.10 Massenbilanz

Um Massenbilanzen durchzuführen, wird das Verhältnis von aufgenommenem Kohlenstoff (C) zu verbrauchtem Sauerstoff (R) betrachtet, sei es in partikulärer Form als POC oder in gelöster Form als DOC. Ist dieses Verhältnis > 1 , ist die Bilanz positiv und es sollte ein Wachstum der Versuchsorganismen unter den gegebenen Konditionen möglich sein. Bei der Bilanzierung muss auch die Translokation von durch Symbionten fixiertem Kohlenstoff berücksichtigt werden. Diese Translokation von Kohlenstoff wurde bei Korallen eingehend untersucht, aber auch bei Schwämmen aus flachen tropischen und gemäßigten Meeren nachgewiesen (Wilkinson and Fay, 1979).

3.11 Methoden zur Kultivierung von Schwammbiomasse

Um die Vielfalt der Naturstoffe aus Schwämmen klinischen Studien zugänglich zu machen, stellt es eine große Herausforderung dar, ausreichende Mengen an Schwammbiomasse zu gewinnen. In den meisten Fällen ist die natürliche Population jedoch zu gering oder unzugänglich, so dass eine wirtschaftliche Nutzung möglich wäre (Pomponi, 1999).

Aus Sicht der biotechnologischen Produktion können drei Möglichkeiten zur Gewinnung von Naturstoffen aus Schwämmen unterschieden werden: Einmal direkte Genprodukte, Proteine, die normalerweise durch rekombinante Expression in geeigneten Mikroorganismen produziert werden. Zweitens Sekundärmetabolite der schwammassoziierten Mikroorganismen die durch Reinkulturen nach Isolation aus dem Schwamm produziert werden können. Drittens schwammspezifische Sekundärmetabolite, die ausschließlich durch Extraktion von Schwammbiomasse zu gewinnen sind.

3.11.1 Marikultur

Seit der Antike werden natürlichen Vorkommen der Mittelmeerschwämme der Gattung *Spongia* und *Hippospongia* für kommerzielle Zwecke geerntet. Einen Überblick über die Geschichte der Schwammkultivierung im Mittelmeer gibt Pronzato (1999). Bei Marikulturen werden gezielt Besiedlungsflächen im natürlichen Lebensraum geschaffen. Der Vorteil ist die Versorgung der Tiere mit allen lebensnotwendigen Nährstoffen. Nachteil sind die unkontrollierbaren Bedingungen, die im schlimmsten Fall zum Zusammenbruch der gesamten Kultur führen können (Pronzato, 1999). Auch Naturkatastrophen wie Stürme oder Algenblüten können Marikulturen stark beeinträchtigen. Während der letzten Jahrzehnte wurden einige Ansätze verschiedener Marikulturen zur Kultivierung von Schwamm-biomasse vorgestellt (Pronzato *et al.*, 1999).

3.11.2 *Ex-situ* Kultur

Die Vorteile der *ex-situ* Kultur sind kontrollierte Bedingungen, ein Einfluss saisonaler Schwankungen ist ausgeschlossen. Infektionen mit pathogenen Keimen lassen sich durch Gabe von Antibiotika oder durch Wasseraufbereitung, wie der UV-C Entkeimung, verhindern. Eine dauerhafte Kultivierung mariner Schwämme über Zeiträume länger als ein Jahr ist kaum möglich. *Ex-situ* Kultivierungen eröffnen die Möglichkeit, Grundlagenverständnis zu entwickeln, um zu verstehen, welche Parameter Einfluss auf die Biologie der Schwämme nehmen. Dazu gehören Wasseraufbereitung, Kultivierungstemperatur, Beleuchtungsintensitäten und Nahrungsversorgung. Zu diskutieren ist der Einfluss dieser Bedingungen auf die Zusammensetzung des Mikroorganismenspektrum und folglich auch eine mögliche Veränderung im Metabolitenspektrum. Bisher finden sich nur wenige Untersuchungen zur Kultivierung funktioneller Schwämme unter künstlichen Bedingungen (Barthel and Theede, 1986; de Caralt *et al.*, 2003; Duckworth *et al.*, 2003; Mendola, 2003; Osinga *et al.*, 2003).



Abbildung 3.10: Ein Modulbecken der Aquarienanlage zur *ex-situ* Kultivierung mariner Schwämme am Lehrstuhl für technische Biologie der Universität Karlsruhe.

Erfolgreiche Berichte zur Kultivierung von Schwammbiomasse unter Laborbedingungen finden sich von Alan Duckworth und Shirley A. Pomponi (2005) sowie von El Hassan Belarbi *et al.* (2003).

Für den Schwamm *Halichondria melanadocia* wiesen Alan Duckworth und Shirley A. Pomponi mit einer Futtermischung bestehend aus Bakterien, Mikroalgen und Hefen ($< 10 \mu\text{m}$) eine Wachstum nach. Die durchschnittliche Biomassezunahme von *H. melanadocia* innerhalb von sechs Wochen war bei Gabe der gemischten Diät 40 % größer als bei reiner Bakterienfütterung, höchstwahrscheinlich durch den höheren Kohlenstoffgehalt in den verwendeten Mikroalgen und Hefen sowie anderer essentieller Nährstoffe. Der ermittelte Kohlenstoffbedarf für *H. melanadocia* für die Deckung des Grundumsatzes entsprach $0,356 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{L}^{-1}$ Schwamm bzw. $103 \mu\text{g C} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Trockengewicht.

Einige der Schwämme schienen dabei ihre Oberfläche für die Aufnahme der Futterpartikel zu optimieren (Duckworth and Pomponi, 2005).

El Hassan Belarbi *et al.* (2003) zeigte für Gewebestücke des inkrustierend wachsenden Mittelmeerschwammes *Crambe crambe* eine Zunahme des Anfangsgewichtes um 1380 % innerhalb der Versuchsdauer von 22 - 45 Tagen, wobei das stärkste Wachstum in den ersten zehn Tagen der Kultivierung gemessen wurde. Die Versuche wurden in natürlichem Seewasser durchgeführt. Als Futterorganismus diente die marine Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (Belarbi *et al.*, 2003). Die Änderung der Schwamm biomasse wurde über Unterwassergewichtsbestimmung nach Ronald Osinga *et al.* (1999) durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte vergleichend in diskontinuierlichen und kontinuierlichen Durchflusssystemen. Im diskontinuierlichen Durchflusssystem betrug das mittlere Wachstum 322 % und war damit wesentlich geringer als das im kontinuierlichen Durchflusssystem. Die Wachstumskinetiken zeigten einen beträchtlichen Unterschied zwischen den einzelnen Schwammfragmenten.

3.11.3 Nahrungsversorgung bei der *ex-situ* Kultivierung

Die quantitative und qualitative Nahrungsversorgung von Schwämmen unter *ex-situ* Bedingungen scheint eines der Hauptprobleme bei der Schwammkultivierung zu sein. Walter Arndt postulierte 1928, dass die Hauptursache für das Verenden von Schwämmen unter künstlichen Haltungsbedingungen auf mangelnde Versorgung mit adäquatem Futter zurückzuführen ist (Arndt, 1928). Bei der Verwendung von künstlichem Seewasser, welches frei von Nahrungspartikeln ist, scheint das am schwierigsten zu lösende Problem die Versorgung der Schwämme mit adäquaten Futterpartikeln. Bei der Auswahl eines adäquaten Futterorganismus wurden verschiedene Kriterien berücksichtigt.

Unter künstlichen Kulturbedingungen sollte bei Versorgung der Schwämme mit Pico- und Nanoeukaryoten in höheren Konzentration die besten Wachstumsraten zu erwarten sein, vorausgesetzt die Filtrationsraten werden durch den größeren Partikeldurchmesser nicht inhibiert, wie Ronald Osinga *et al.* (2001) für *Pseudo-*

suberites aff. *andrewsi* bei Verwendung der Alge *Dunaliella tertiolecta* gezeigt hat.

Ein Futterorganismus für Schwämme muss in seinem filtrierbaren Größenbereich zwischen 1 und 10 μm liegen. Er darf nicht pathogen sein und sollte halotolerant sein. Der Futterorganismus sollte leicht kultivierbar sein, um die benötigten Mengen zugeben zu können. Die hierzu notwendige Futterpartikelmenge lässt sich bei Kenntnis der Respirationsrate R über folgende Gleichung abschätzen:

$$\text{Partikelzahl} = R / (F \cdot C_p) \text{ mL}^{-1}$$

R ist die Respirationsrate in $\text{mg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{mL}^{-1}$ Schwammgewebe pro Zeiteinheit, F ist die Partikelfiltrationsrate in $\text{mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ Schwammgewebe pro Zeiteinheit und C_p entspricht dem Kohlenstoffgehalt eines Futterpartikels in Milligramm. In den bisher beschriebenen Schwammkultivierungsversuchen wurden lebende oder abgetötete Kulturen von verschiedenen Mikroorganismen als Nahrungsquelle für Schwämme eingesetzt.

Eine Übersicht über die in bisherigen Versuchen zur Schwammkultivierung veröffentlichten Daten der verwendeten Algen oder Bakterien sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Bei Schwammkultivierungsversuchen verwendete Futterpartikel

Schwammart	Futter	Darreichung	Quelle
<i>Cliona celata</i>	Unfiltriertes Meerwasser	Kontinuierlich	Warburton (1958)
<i>Ephydatia fluviatilis</i> <i>Spongilla alba</i>	<i>Escherichia coli</i>	Batch	Poirrier <i>et al.</i> (1981)
<i>Halichondria panicea</i>	Liquifry marine*	Batch	Langenbruch (1983)
	Liquizell*	Batch	
	Getrocknetes Phytoplankton	Batch	
<i>Halichondria panicea</i>	Unfiltriertes Meerwasser	Kontinuierlich	Barthel and Theede (1986)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch	
<i>Halichondria panicea</i>	<i>Rhodomonas</i> sp.	Kontinuierlich	Thomassen and Riisgård (1995)
<i>Microciona prolifera</i>	<i>Dunaliella euchlora</i>	Batch	Simpson (1968)
	<i>Isochrysis galbana</i>	Batch	
<i>Ophlitaspongia seriata</i>	<i>I. galbana</i>	Batch	Fry (1971)
	<i>Micromonas squamata</i>	Batch	
	<i>Monochrysis Lutheri</i>	Batch	
	<i>Tetraselmis suecica</i>	Batch	
	abgetötete Bakterien (überwiegend <i>Pseudomonas</i> und <i>Arthrobacter</i>)	Batch	
<i>Pseudosuberites andrewsi</i>	<i>Dunaliella</i> sp.	Kontinuierlich	Osinga <i>et al.</i> (1998)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch	
<i>Pseudosuberites andrewsi</i>	<i>Phaeodactylum tricornotum</i> (intakte Algen und Rohextrakt)		Osinga <i>et al.</i> (2003)
<i>Crambe crambe</i>	<i>Phaeodactylum tricornotum</i>		Belarbi <i>et al.</i> (2003)
<i>Corticium candelabrum</i>	heterotrophe mediterrane Bakterien und <i>Chlorella</i> sp.	Batch	de Caralt <i>et al.</i> (2003)
<i>Axinella corrugata</i>	Mischung verschiedener Bakterien, Mikroalge und Hefe (<i>Marinococcus halophilus</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Batch	Duckworth <i>et al.</i> (2003)
<i>Halichondria melanadocia</i>	Mischung verschiedener Bakterien, Mikroalge und Hefe (s.o.)	Batch	Duckworth and Pomponi (2005)
<i>Dysidea avara</i> , <i>Crambe crambe</i>	<i>P. tricornotum</i>	Kontinuierlich	de Caralt <i>et al.</i> (2007)

* Kommerzielle erhältliche Produkte der Aquaristik.

3.11.4 Kultivierung von marinen Schwämmen in Aquarien

Viele Schwammarten sterben in Aquarien nach kurzer Zeit ab. Ursachen sind meistens Infektionen oder der Mangel an genügend Nahrungspartikeln. Eine Schwammart, die sich im Aquarium hervorragend hält und in der Lichtzone sehr gut wächst, ist der im Jahre 1990 wissenschaftlich beschriebene Ohrenschwamm *Collosporgia auris*. Der Schwamm bildet flächige Kolonieformen und ist in Riffaquarien gut haltbar (mündliche Mitteilung Johannes Kirchhauser, Vivarium Karlsruhe). Bei dieser Schwammart handelt es sich um einen grünblauen Schwamm, der eine lederähnliche, sehr reißfeste Kruste ausbildet und in Symbiose mit Cyanobakterien lebt. Die gute Kultivierbarkeit in der Lichtzone scheint durch die Anwesenheit stickstofffixierender Symbionten gegeben zu sein.

Andere Schwammarten entwickeln sich im Aquarium nach der Einfahrphase durch das Einbringen so genannter „lebender Steine“ aus dem Meer von selbst. Meistens handelt es sich dabei um kryptische Arten in strömungsarmen und dunklen Zonen. Diese Kolonien werden meistens beim Ausräumen oder Umgestalten des Aquariums sichtbar, wenn Dekorationssteine umgedreht werden.

3.11.5 Strömung

Wie viele Filtrierer vertragen Schwämme in der Regel keine starke Wasserbewegung, die Filtration funktioniert nur bei einer bestimmten Strömungsgeschwindigkeit optimal. Im Gegensatz dazu benötigen beispielsweise Weichkorallen aus der Tiefenzone des Riffes recht hohe Strömungsstärken, um ihre Nahrung zu fangen. Die Kolonieform vieler Schwammarten ist an die speziellen Wasserströmungsbedingungen des jeweiligen Standortes angepasst. Eine Veränderung des Strömungscharakters unter Aquarienbedingungen führt häufig zu Änderung des Schwammhabitus. Bei *A. aerophoba* war zu beobachten, dass diese ihr Osculum umbilden und es zu Neubildungen im strömungsabgewandten Bereich kommt. *Chondrosia reniformis* war in der Lage, aus zu starken Strömungen aktiv abzuwandern. Dieser Vorgang vollzieht sich über mehrere Tage, die Bewegungen des Organismus können über Fotoserien sichtbar gemacht werden.

Zu geringe Strömung führt dagegen zu Bakterienwachstum auf der Schwammoberfläche. Handelt es sich dabei um infektiöse Keime, kann dies zum Absterben der Schwämme führen, wie für den marinen Schwamm *Halichondria panicea* gezeigt wurde (Hummel *et al.* 1988).

3.11.6 Ursachen und Folgen für das Absterben von Schwämmen

Ernste Probleme mit Schwämmen unter Aquarienbedingungen ergeben sich, wenn ein Schwamm abstirbt und sich sein Gewebe auflöst. Die dabei frei werdenden Gifte können den gesamten Bestand vernichten. Bei *A. aerophoba* zeigen blau-schwarze Verfärbungen nekrotisches Gewebe an. Durch gezieltes Abstoßen dieses abgestorbenen Gewebes ist der Schwamm in der Lage, den Rest der Schwammkolonie vor weiteren Schädigungen durch die bereits abgestorbenen Zellen zu schützen.

Die Kultivierung von Schwämmen setzt voraus, dass keine Organismen im Aquarium leben dürfen, die sich von diesen ernähren oder sie schädigen wie beispielsweise der auf *A. aerophoba* spezialisierte Fraßfeind *Tylodina perversa*. Eventuell anhaftende Gelege dieser Meeresschnecke müssen sofort entfernt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Sammeln und Transport der Versuchsschwämme

Alle Versuchsschwämme stammen aus der Adria und wurden im Limski Kanal in der Nähe von Rovinj (Kroatien) durch unsere Arbeitsgruppe mit autonomen Pressluftgeräten in Tiefen zwischen zwei (2) und 25 Metern Tiefe gesammelt.

Die Schwämme wurden mit einem Teil ihres Substrates mittels Hammer und Meisel oder mit Hilfe eines Tauchermessers vom Untergrund gelöst und unter Wasser in Kunststoffgefäße mit Schraubdeckel (Kautex, D-53229 Bonn) überführt. Mechanischer Stress durch Drücken oder Quetschen wurde vermieden. Die gesammelten Schwämme wurden in ihren Kautex-Gefäßen auf dem Boot in Eimer gestellt, in denen sie während der Überfahrt durch Meerwasser gekühlt wurden, und so zur meeresbiologischen Station von Rovinj befördert. Zur Vermeidung einer Luftexposition erfolgte das Umsetzen der Versuchstiere unter Wasser in von Meerwasser durchflossenen Steinbecken (Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1: Durchflussbecken des Institutes 'Ruđer Bošković' in Rovinj (Kroatien) zur Zwischenlagerung der gesammelten Schwämme.

In diesen mit lokalem Meerwasser durchströmten Steinbecken wurden die Schwämme bis zum Weitertransport nach Deutschland zwischengelagert. Für den Transport wurden die Schwämme unter Wasser in handelsübliche Transportbeutel für Aquarientiere überführt und mit einem Luftpolster versehen verschlossen. Die Luftpolster sorgten während des zwölfstündigen Transportes für ausreichend Sauerstoff und isolierten gleichzeitig das Wasser gegenüber den Kühlakkus. Der Transport nach Deutschland erfolgte in Styroporkisten mit Deckel. Um eine Erwärmung des Wassers über 20 °C auszuschließen erfolgte eine Kühlung der Kisten mit Kühlakkus. Erfahrungen des ersten Proben transports zeigten, dass starke Temperaturwechsel in Richtung höherer Temperaturen zum Absterben aller gesammelten Schwämme führten. Aus diesem Grunde wurden die Schwämme nach dem Transport über Nacht in den geöffneten Transportbeuteln in die Aquarien gestellt, um sie langsam an die umgebende Wassertemperatur der Aquarien im Labor anzupassen. Am nächsten Morgen wurden die Tiere vorsichtig unter Wasser zur Vermeidung einer Luftembolie ihres Kanalsystems in die Aquarien umgesetzt.

4.2 Kultivierung funktioneller Schwämme

Die Kultivierung funktioneller Schwämme unter künstlichen Bedingungen in Aquarien stellt hohe Anforderungen an die Haltungsumgebung. Sie benötigen klares und sauberes, entsprechend temperiertes, künstliches Meerwasser. Als sessile Filtrierer sind Schwämme darauf angewiesen ihre Nahrung dem vorbei strömenden Wasser zu entziehen. Die entsprechende Strömung im natürlichen Lebensraum ist stetig und gleichmäßig und sorgt für Sauerstoffversorgung und Abtransport der Exkretionsprodukte der Schwämme. Eine Strömungspumpe im Becken sollte diese Bedingungen nachbilden. Bei Strömungserzeugung durch die Strömungspumpen ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingetragen werden, da diese zum Absterben der Schwämme führen.



Abbildung 4.2: Schwammkultivierungsanlage am Lehrstuhl für technische Biologie, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Universität Karlsruhe (TH)

4.2.1 Entwicklung und Konstruktion der Aquarienanlage

Die Konstruktion der Aquarienanlage wurde speziell nach den besonderen Bedürfnissen der Schwämme ausgelegt und im Laufe der Arbeit weiterentwickelt. Sie sollte einen guten Zugang zu den Schwämmen gewährleisten und die Möglichkeit zur Beobachtung und Entnahme der Schwämme für Versuche vereinfachen. Für diese Anforderung ist die Auflage der Aquarien in einer Arbeitshöhe von 100 Zentimeter angebracht. Die Beckenhöhe beträgt im Gegensatz zu Standardaquarien nur 20 Zentimeter, damit die Versuchstiere für Untersuchungen leicht entnommen werden können. Abbildung 4.2 zeigt die Anlage in Betrieb.

Für vergleichende Versuche wurde die Anlage aus sechs technisch identischen Modulen aufgebaut.

Die Abbildung 4.3 zeigt den schematischen Aufbau der Anlage exemplarisch für ein Modul.

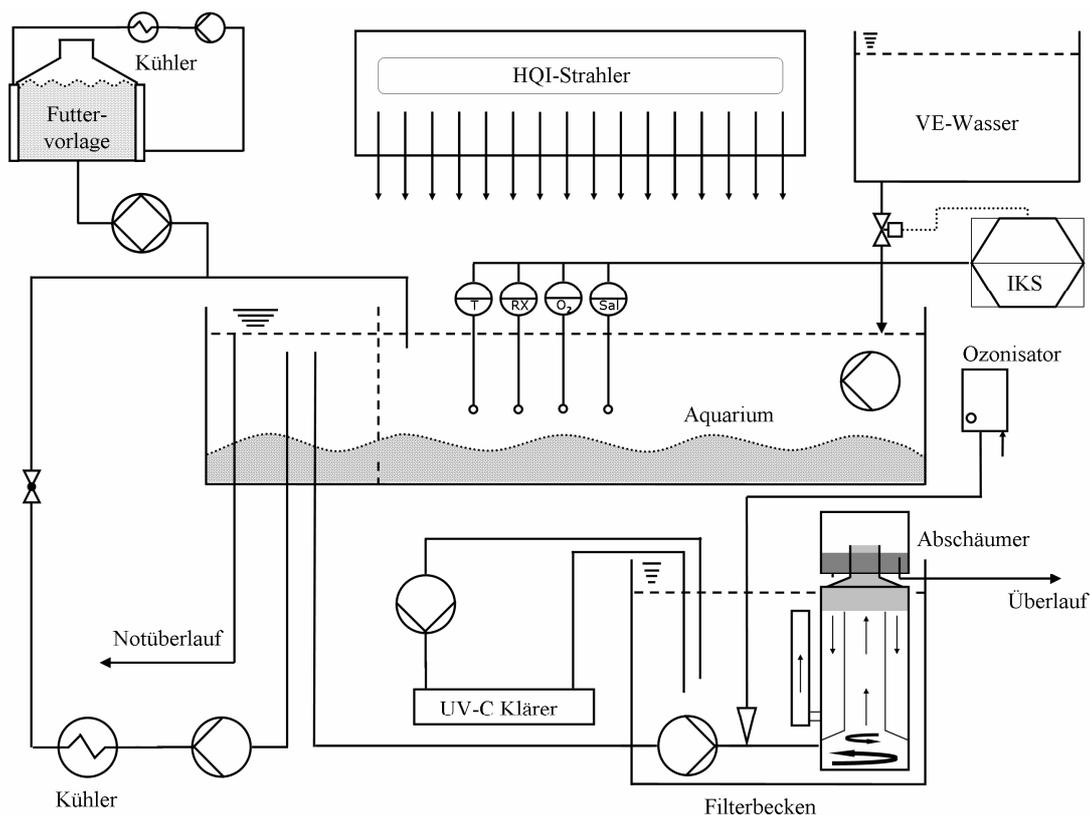


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau eines Moduls der Versuchsanlage zur Haltung mariner Schwämme

Ein Modul besteht aus zwei mit Aquariensilikon verklebten Glasbehältern, der Schwammzuchteinheit mit den Maßen 80 · 70 · 20 cm und der darunter angeordneten Filtereinheit mit Vorfilter 40 · 35 · 35 cm. Dieser Vorfilter verfügt über angepasste Überläufe für den Abschäumer und einen Notüberlauf.

Die Schwammzuchteinheit besitzt einen separaten Ablaufschacht zur Filtereinheit mit drei Bohrungen für den Filterzulauf und Filterablauf sowie einen separaten Notüberlauf.

Die Schwammzuchteinheit ist mit der Filtereinheit über eine PVC-Verrohrung verbunden. Der Volumenstrom des Rücklaufes ist über ein Membranventil (Typ 314PVC-U, d20 DN15 ½“, Georg Fischer GmbH Rohrleitungssystem, D-73095 Albershausen) stufenlos bis zur maximalen Förderleistung von 1000 Liter pro Stunde regelbar. Das gesamte Filtermodul ist austauschbar.

Zur Erzeugung einer sanften und breit gefächerten Strömung bei hohen Durchflussmengen wurde eine Turbelle verwendet (TUNZE stream 6060, Strömungsleistung: $6000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, Leistung: 11 Watt; Maße: $\varnothing 98 \times 118 \text{ mm}$, Ausstoßöffnung: $\varnothing 50 / 47 \text{ mm}$; TUNZE Aquarientechnik GmbH, D-82377 Penzberg).

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass die durch die Pumpe erzeugte Strömung für das Beckenvolumen zu stark ausgelegt war und zur Deformierung der Schwämme führte. Eine verbesserte Strömung wurde durch den Einsatz eines speziell angefertigten PVC-Rohres erreicht. Der Durchmesser beträgt 50 mm und verfügt im Abstand von jeweils 20 mm über Bohrungen mit einem Durchmesser von 20 mm. Die Länge des Rohres erstreckt sich über die gesamte Länge des Beckens. Der ursprüngliche Strömungsverlauf und das aus der Modifizierung resultierende Strömungsmuster ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

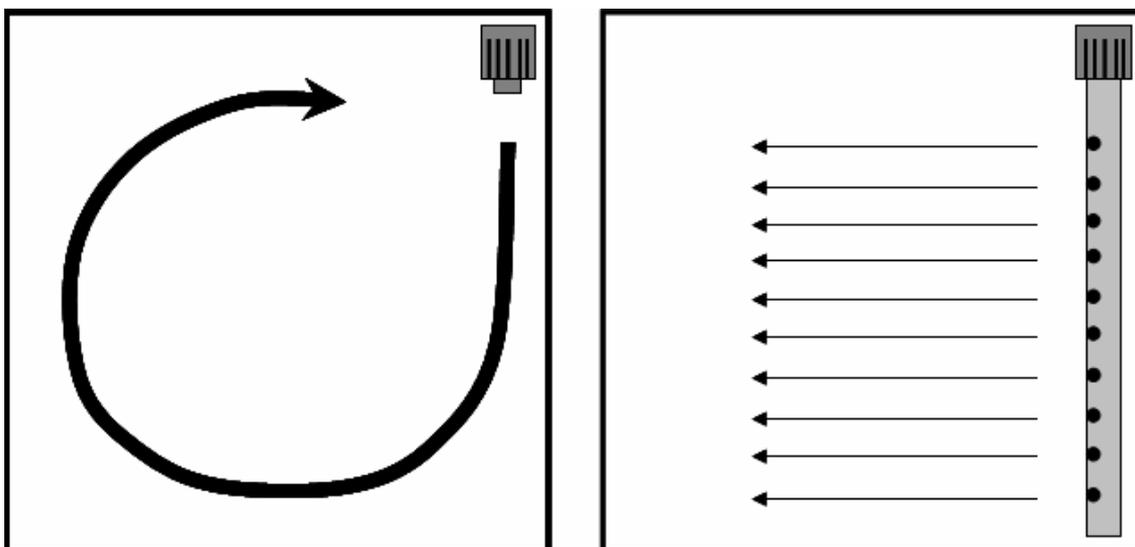


Abbildung 4.4: Aufsicht auf die Modulbecken der Aquarienanlage mit Strömungsverlauf vor (links) und nach (rechts) Optimierung der Strömungspumpe.

Alle anderen verwendeten Pumpen waren Kreiselpumpen des Typs AquaBee UP 1000, Förderleistung $1000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, Leistungsaufnahme 10 Watt, Maximale Förderhöhe 1,3 Meter, AquaBee Aquarientechnik, (D-39261 Zerbst).

Die Pumpleistung der Pumpe im Rücklauf vom Filterbecken in das Aquarienmodul wurde auf vier Liter pro Minute eingestellt und betrug damit 24 % der angegebenen Förderleistung.

4.2.1.1 Wasseraufbereitung

Die Wasseraufbereitung erfolgte in einem separaten Filterbecken, welches im Unterschied zu herkömmlichen Filteranlagen in der Aquarientechnik ohne mechanische Filtereinheiten wie Kunstschwammeinsätze auskommen sollte.

4.2.1.2 UV-C-Bestrahlung

Die Wasserentkeimung erfolgte über einen UV-Entkeimungsgerät (Top Tronic Typ 6/IV, 85 Watt UV-C-Hochdruckbrenner im Quarzglasrohr, Mindestdurchflussmenge $60 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, Max. Durchflussmenge: $2500 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, Tropic-Electronic GmbH, D-58511 Lüdenscheid) als Sondermodell zum Direktanschluss an das Filtersystem. Dieses wurde im Bypass mit einer separaten Kreiselpumpe der Filtereinheit betrieben.

4.2.1.3 Abschäumung

Die Technik der Abschäumung oder Flotation dient der Eliminierung von Proteinen aus dem Wasser, ohne dass sie mikrobiologisch zu den Endprodukten oxidiert werden. Bei plötzlicher Belastung, z.B. durch einen absterbende Schwammkolonie oder verstärkter Belastung durch Nahrungspartikel, kann ein biologischer Filter nur sehr langsam auf diese Belastung reagieren. Insbesondere nitrifizieren-

de Bakterien haben Anpassungszeiten von mehreren Tagen. Zusätzlich erhöht sich das Redoxpotential des Wassers.

Im Pumpenzulauf werden feinste Luftblasen erzeugt, an denen sich durch Adhäsion Moleküle anlagern. Im Steigrohr bildet sich ein Schaum, der immer zäher wird, bis er in einem Schaumtopf abgeschieden wird. Durch Zugabe von Ozon lässt sich die Effizienz eines Abschäumers um ein Vielfaches steigern.

In der Aquarienanlage kam ein ATS TECH Schäumer Typ II (Aquarienanlagen Schuhmacher) zum Einsatz. Es handelt sich um einen selbst regelnden, pumpenbetriebenen Düsenabschäumer für den internen Betrieb mit Stutzen zum Anschluss eines Ozonisators. Er verfügt über einen vergrößerten Schaumtopf mit einer Luftleistung von $800 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$.

4.2.1.4 Ozonbehandlung

Die Ozonbehandlung des Aquariengewässers dient der Desinfektion durch Oxidation pathogener Keime und der Oxidation von nicht oder nur schlecht abbaubaren organischen Spurenstoffen. Dazu gehören Humin- bzw. Gelbstoffe, die als Ab- und Umbauprodukte von pflanzlichem und mikrobiologischem Material entstehen (Abbt-Braun, 2002) und toxische Stoffwechselprodukte der Schwämme selbst. Der Ozonisator erhöht zusätzlich das Redoxpotential und den Sauerstoffgehalt des Aquariengewässers. In der Anlage wurde der Ozonisator der Firma Sander eingesetzt (Ozonisator Certizon 100, Ozonleistung stufenlos einstellbar ($10 - 100 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$), Leistungsaufnahme 4,8 Watt, Luftdurchsatz $20 - 500 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, empfohlener Aquarieninhalt: 200 – 1000 Liter, Erwin Sander Elektroapparatebau GmbH - D-31311 Uetze-Eltze).

4.2.1.5 Beleuchtung

Zur Beleuchtung der Schwammzuchteinheiten wurden anfänglich in der Aquaristik übliche Leuchtstoffröhren installiert. Die geringe Lichtintensität von etwa

$10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und das sich innerhalb kurzer Zeit negativ veränderte Lichtspektrum führten jedoch zu Schmieralgenbildung, die sich negativ auf das gesamte Aquariensystem auswirkten.

Die Beleuchtung wurde daraufhin umgestellt und durch Hallenleuchten (Typ 7981SD/HST-HIT250 K, TRILUX GmbH & Co. KG, D-59759 Arnsberg) ersetzt. Als Leuchtmittel kamen Halogen-Metaldampflampen vom Typ HIT 250 W von Osram zum Einsatz.

Die Lichtintensität, gemessen an der Wasseroberfläche, betrug $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

4.2.1.6 Künstliches Seewasser

Das künstliche Seewasser oder „artificial seawater“ (ASW) wurde mit einer handelsüblichen Meersalzmischung (Tropic Marin®, Dr. Biener GmbH, D-36367 Wartenberg) unter Verwendung von VE-Wasser in einem Vorratsbecken angesetzt. Nach dem Lösen des Salzes in 210 Liter VE-Wasser wurde es durch eine Kreiselpumpe permanent bewegt und mittels einer Membranpumpe durchlüftet. Diese „Alterung“ des Seewassers wurde vor der Verwendung in den Aquarien für mindestens einen Tag durchgeführt. Die Salinität wurde auf 34,6 ‰ eingestellt.

4.2.1.7 Überwachung der Wasserparameter

Durch das hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Aquarien verdunsteten im Schnitt 10 % des Wasservolumens pro Woche. Der Sollwert wurde nach Messungen der Salinität im natürlichen Habitat auf eine Salinität von 36,4 ‰ festgelegt. Um die Salinität in einem engen Bereich konstant zu halten, wurde eine wartungsarme Regelung verbaut. Die Salinität wurde mit einem Leitwertsensor (iks ComputerSysteme GmbH, D-76307 Karlsbad) aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte monatlich mit einer Kalibrierlösung mit einer Leitfähigkeit von 50 mS/cm.

Zur automatischen Nachregulierung des Aquarienwassers wurde VE-Wasser verwendet. Das Vorratsgefäß war über der Anlage aufgestellt. Über Falleleitungen wurde aus einem Vorratsbehälter aus Glas mit einem Volumen von 240 Liter nachdosiert. Bei Überschreitung des für die Salinität festgelegten Grenzwert, öffnet ein über den IKS aquastar gesteuerte Stromsteckleiste ein in den Falleleitungen eingebautes Magnetventil. Durch den hydrostatischen Druck läuft das Wasser in die Becken nach. Der Einlauf des VE-Wassers war direkt über der Strömungspumpe angebracht, so dass eine sofortige Durchmischung gewährleistet wurde. Bei Erreichen des unteren Schwellenwertes schloss das Ventil.

Aus Sicherheitsgründen kamen Magnetventile zum Einsatz welche stromlos geschlossen waren. Ein Verdünnen des Aquarienwassers mit VE-Wasser bei Stromausfall war somit ausgeschlossen.

4.2.1.8 Aquarienroutine

Der routinemäßige Wasserwechsel umfasste einen wöchentlichen Austausch von 20 Prozent des Aquarienwassers, um einer Auszehrung der Mikro- und Makroelemente entgegenzuwirken. Die Werte für Nitrat und Phosphat wurden mit handelsüblichen Testkits überprüft und auf die entsprechenden Sollwerte korrigiert. Zu hohe Werte wurden durch Wasserwechsel ausgeglichen, zu niedrige Werte für Stickstoff und Phosphat wurden durch Gabe von Stocklösungen eingestellt.

Stocklösung 1: NaNO_3 137g/L: Zugabe 1 mL auf 100 Liter zur Erhöhung der Nitratkonzentration um $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Stocklösung 1: NaH_2PO_4 (0,005 M): Zugabe 1 mL auf 100 Liter zur Erhöhung der Phosphatkonzentration um $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Stocklösung 2: Eisencitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), (0,01 M): Zugabe 1 mL auf 100 Liter pro Woche

Tabelle 4.1: Schwankungsbreite der Wasserparameter in den Aquarienmodulen

Temperatur	18 – 22 °C
pH	7,8 – 8,2
Salinität	34,4 – 38,6 ‰
Nitrate (NO ₃ ⁻)	0 – 10 mg · L ⁻¹
Nitrite (NO ₂ ⁻)	0 – 0,05 mg · L ⁻¹
Phosphate (PO ₄ ³⁻)	0 – 1 mg · L ⁻¹
Magnesium (Mg ²⁺)	1480 – 1660 mg · L ⁻¹
Calcium (Ca ²⁺)	390 – 440 mg · L ⁻¹

4.3 Bestimmung der Schwammbiomasse

4.3.1 Volumenbestimmung durch Wasserverdrängung

Schwammvolumina wurden über die durch ihn verdrängte Wassermenge gravimetrisch bestimmt. Eine dauerhafte Verwendung dieser Methode ist ungünstig, da der Schwamm hierbei dem Luftsauerstoff ausgesetzt wird. Zur Messung wurde das Gefäß mit ASW ohne Schwamm auf einer Laborwaage (BP 3100 S, Sartorius, D-37075 Göttingen) auf Null kalibriert. Eventuell übergelaufenes Wasser wurde entfernt. Anschließend wurde der Schwamm in das Gefäß überführt und das Differenzgewicht bestimmt. Das Gewicht des verdrängten Wassers wurde daraufhin in das Schwammvolumen umgerechnet.

4.3.2 Volumenbestimmung durch Vermessung

Die Bestimmung des Volumens von *A. aerophoba* gestaltete sich aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Luftexposition schwierig.

Beim Sammeln der Versuchsschwämme wurden nur solche Individuen ausgesucht, die einen einzigen Schlot mit annähernd rotationssymmetrischem Bau aufwiesen (Abbildung 4.5). Die Vermessung der Schwämme erfolgte unter Wasser mit einem Messschieber aus Kunststoff. Dabei wurde die Höhe und der Durchmesser bestimmt und daraus deren Volumen berechnet. Die Zylinderform wurde als mathematische Berechnungsgrundlage angenommen.



Abbildung 4.5: Beispiel eines Versuchsschwammes *A. aerophoba* mit einem Schlot auf Kalkstein mit Korallenkleber fixiert.

4.3.3 Bestimmung des Feuchtgewichtes, Trockengewichtes und aschefreien Trockengewichtes der Versuchsschwämme

Vor der Bestimmung wurden Porzellanschalen in einem Trockenschrank (WTB Binder, D-78532 Tuttlingen) bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Bestimmung des Feuchtgewichtes erfolgte durch Wägung des frischen Schwammes nach Abtropfen auf einer Feinwaage (BP 211 D, Sartorius, D-37075 Göttingen). Die anschließende Trocknung der Schwammbiomasse erfolgte bei 100 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz. Die Verbrennung wurde im Muffelofen (M110 mit Thermicon P, Heraeus, D-63450 Hanau) bei 500 °C für 8 Stunden vorgenommen. Das AFDW errechnet sich aus der Differenz des ermittelten Trockengewichtes und dem Gewicht des Verbrennungsrückstandes.

4.4 Filtrationsexperimente

4.4.1 Allgemeines

Zur Abschätzung der benötigten Mengen an Futterpartikeln und zur Beurteilung, ob die untersuchten Schwämme in der Lage sind unter Aquarienbedingungen ihren Kohlenstoffbedarf zu decken, wurden Partikelaufnahmeleistungen für Modellfutterpartikel bestimmt. In Filtrationsexperimenten wurde die Abnahme der Partikelkonzentrationen über die Zeit aufgenommen.

Die Konzentrationen wurden nicht chronologisch gesteigert, sondern alternierend höhere bzw. geringe Partikelkonzentrationen eingesetzt, um den Einfluss der über die Kultivierungsdauer auftretenden Degenerationserscheinungen und die damit einhergehenden Unterschiede in den Filtrationsaktivitäten der Schwämme zu minimieren

Die Filtrationsexperimente wurden mit zwei verschiedenen Futterorganismen durchgeführt. Es handelte sich dabei um die marine kokkoide Cyanobakterie *Synechococcus spec.* mit einer durchschnittlichen Größe von 1 μm und der marinen Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* mit einer durchschnittlichen Größe von 5 μm . Jede einzelne Art wurde axenisch in Schüttelkolben gezüchtet. Die Medien basierten auf künstlichem Meerwasser und sind im Anhang aufgeführt.

4.4.2 Versuchsaufbau

Schwämme der Art *A. aerophoba* reagieren auf Störungen, wie das Umsetzen in Bechergläser extrem empfindlich. Das Umsetzen führte dazu, dass die untersuchten Schwämme über längere Zeiträume die über mehrere Minuten bis Stunden andauerten, keine Pumpaktivität zeigten und somit die Durchführung der Filtrationsexperimente sehr erschwerten. Der methodische Aufbau wurde in den letzten, zur Auswertung herangezogenen Versuchsserien, dahingehend optimiert, den störenden Einfluss des Umsetzens zu minimieren.

Die zu untersuchenden Schwämme wurden unter Wasser auf Hart-PVC-Scheiben gestellt und blieben dort auch während der Haltung. Vor Versuchsbeginn wurden speziell angefertigte Kunststoffröhren über die Hart-PVC-Scheiben mit den Versuchsschwämmen geschoben und gegenüber dem umgebenden Aquarienwasser dicht abgeschlossen.

Das berechnete Volumen der Versuch Gefäße betrug 530 mL. Bei der Berechnung der Filtrationsrate wurde das individuelle Volumen des Schwammes abgezogen. Nach einer Stunde Ruhephase wurde eine Algensuspension mit definierter Konzentration zugegeben.

Die Probennahme für die Partikelkonzentrationsbestimmung erfolgte über einen Zeitraum von 40 Minuten.

Durch Multiplikation der Anzahl durch den Schwamm gefilterten Zellen pro Zeiteinheit und dem zellgruppenspezifischen Kohlenstoffäquivalent wurde die aufgenommene Kohlenstoffmenge ermittelt. Die Umrechnung der verwendeten Futterorganismen in entsprechende Kohlenstoffäquivalente geschah mit folgenden Umrechnungsfaktoren: heterotrophe Bakterien, $20 \text{ fg C Zelle}^{-1}$ (Ducklow *et al.*, 1993); *Synechococcus* sp., $470 \text{ fg C Zelle}^{-1}$ (Campbell *et al.*, 1994) und für *P. tricornutum* $14,5 \text{ pg C Zelle}^{-1}$ (Strathmann, 1967).

4.4.3 Partikelkonzentrationsbestimmung

Zur Messung der in den Wasserproben enthaltenen Zellkonzentration und zur Aufzeichnung der Größenverteilungen wurde der CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System GmbH, D-72764 Reutlingen) eingesetzt.

Die Proben wurden direkt vor dem Messen frisch angesetzt beziehungsweise entnommen. Für jede Messung wurden neue CASY® cups verwendet, um Fehler durch verschmutzte Messbecher auszuschließen. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen mit einem Messvolumen von 200 μL durchgeführt.

Die Messungen erfolgten je nach Größe des eingesetzten Futterpartikels mit einer 45 μm oder einer 60 μm Kapillare. Die 45 μm Kapillare wurde speziell für die Anwendung in der salzhaltigen Matrix werkseitig anstatt auf die handelsübliche

eingesetzte Elektrolytlösung CASY®ton auf in der Aquarienanlage verwendete ASW kalibriert. Für die Mikroalge *P. tricorutum* war aufgrund ihres größeren Zelldurchmessers die Verwendung der 60 µm Kapillare notwendig. Diese war jedoch werkseitig auf das standardisierte CASYton® kalibriert, welches dem Salzgehalt einer isotonischen Kochsalzlösung von 0,9 % entspricht. Die Partikelgröße wird bei der Verwendung von Meerwasser durch die höhere Leitfähigkeit kleiner dargestellt, die absoluten Partikelzahlen der Messungen bleiben davon aber unbeeinflusst und können deshalb zur Messung der Abnahme der Partikelkonzentration verwendet werden.

Nach dem Einschalten des Gerätes wurde 3-mal mit CASY®clean gespült, um eventuell verbliebene Partikel von anderen Messungen zu entfernen. Die Messkapillare wurde vor dem Beginn der Messungen zweimal mit sterilfiltriertem ASW gespült. Anschließend wurde eine Probe der Pufferlösung auf ihren Partikelgehalt vermessen. Vor Messbeginn, wurde ein Messwert von 500 Partikeln absolut als Nullwert definiert.

Bei Überschreitung des maximalen Zählergebnisses des Gerätes wurden die Proben mit sterilem ASW verdünnt, zu hohe Partikelkonzentrationen sind außerhalb des linearen Bereichs des Messgerätes. Diese Messungenauigkeiten wurden über eine Fehlermitteilung des Messgerätes angezeigt.

Die Datenübertragung der Messwerte erfolgte über eine COM-Port Schnittstelle an einen Desktop-PC, das Einlesen der Daten und die Darstellung der Ergebnisse wurde mit der Software CASYExcel durchgeführt.

4.4.4 Verwendete Futterorganismen und Kulturbedingungen

Die unterschiedlichen Versuche wurden mit lebenden marinen Bakterien und Mikroalgen durchgeführt, die den Schwämmen auch im natürlichen Lebensraum als Nahrungspartikel zur Verfügung stehen.

4.4.5 Kultivierung mariner heterotropher Bakterien

Zwei marine heterotrophe Bakterienstämme, *Janibacter limosus* (Hel01), ein kokkoides bis stäbchenförmiges, unbewegliches, aerobes, gram-positives Bakterium und *Halomonas variabilis* (Hel04), ein bewegliches, stäbchen-förmiges, gram-positives Bakterium, wurden von Dr. Irene Wagner-Döbler zur Verfügung gestellt (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, D-38124 Braunschweig).

Die marinen Bakterien α -Proteobakterium (SB89) und *Vibrio* sp. (SB177) wurden sowohl aus Meerwasser als auch aus dem Gewebe mariner Schwämme isoliert. Es wird vermutet, dass sich dieser Stamm besonders gut zur Schwammernahrung eignet, da für *A. aerophoba* eine effektive Aufnahme und mit hohen Phagozytoseraten gezeigt werden konnte (Wehrl, 2001). Diese Stämme wurden von Dr. Ute Hentschel zur Verfügung gestellt (Institut für Mikrobielle Infektionsbiologie, Universität Würzburg, D-97074 Würzburg).

Die marinen Bakterien SB89, SB177, Hel01 und Hel04 wurden in einem Zobell-Flüssigmedium (siehe Tabelle 4.2) bei 20°C im Schüttelkolben bei 100 U · min⁻¹ im Inkubationsschüttler (Multitron 2, Infors, CH-4103 Bottmingen) kultiviert.

Tabelle 4.2: Zobell-Flüssigmedium
(Zusammensetzung entspricht BD Difco™ marine broth 2216, Nr.: 279110)

Komponente	
Pepton	5 g
Hefeextrakt	1 g
in VE-Wasser	250 mL
	Autoklavieren bei 121°C
ASW (Salinität 36,4 ‰) sterilfiltriert*	750 mL

* beim Autoklavieren fallen Carbonate aus

4.4.6 Kultivierung mariner Mikroalgen

Synechococcus sp.

Synechococcus sp. WH 8102 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ilka Axmann, Humboldt-Universität, Institut für Biologie, D-10115 Berlin).

Es handelt sich um ein einzelliges, etwa 1 µm messendes kokkoides, marines Cyanobakterium des Picophytoplankton. Es ist weltweit verbreitet in oligotrophen als auch in eutrophen Regionen der Weltmeere und stellt die Hauptkomponente des Picophytoplanktons dar (Waterbury *et al.*, 1979; Partensky *et al.*, 1999).

Für die Kultivierung von *Synechococcus* sp. wurde das Seewasser-Medium (= SWES) verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4.3 angegeben ist.

Die Beleuchtung erfolgte über ein Leuchtfeld mit 4 Leuchtstoffröhren mit einem Licht / Dunkel-Rhythmus von 16 / 8 Stunden bei 20°C im 2 Liter Schüttelkolben bei 120 U min⁻¹ im Inkubationsschüttler (Multitron 2, Infors, CH-4103 Bottmingen) kultiviert.

Phaeodactylum tricornutum

Für die Filtrationsversuche wurde außerdem die Bacillariophyceae *P. tricornutum* des Stammes SAG 1090-1a (Göttingen, Deutschland) eingesetzt.

P. tricornutum ist eine global verbreitete Brackwasser- und Meeressalzwasseralge mit hohem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Vor allem der hohe Gehalt an Omega-3-Fettsäure ist essentiell für die Entwicklung vieler mariner Organismen und macht sie deshalb zum optimalen Futtermittel in der Aquakultur (Patil *et al.*, 2007). Wegen ihres hohen Nährwerts wird diese Alge als unentbehrliche Nahrungsquelle in der Aufzucht aller Stadien von Muscheln, für die Larvenstadien einiger mariner Gastropoden, den Larven verschiedener mariner Fischarten, die Larvenstadien der Garnelen und für die Zucht von Zooplankton verwendet (Ryther and Goldman, 1975).

Auch bei der Kultivierung des marinen Schwammes *Crambe crambe* (Belarbi *et al.*, 2003) wurde diese Mikroalge eingesetzt. Aus diesem Grunde scheint diese Alge ein nützlicher Nahrungsorganismus für die *ex-situ* Kultur von *A. aerophoba* in Aquarien zu sein.

P. tricornutum wurde in Brackwasser-Medium (SWES1/2) kultiviert. Dieses entspricht in der Zusammensetzung dem SWES-Medium, mit dem Unterschied, dass 50 % des ASW durch VE-Wasser ersetzt wurde. Die Beleuchtung erfolgte durch ein über den Kulturen installiertes Leuchtfeld mit acht Leuchtstoffröhren mit einem Licht / Dunkel-Rhythmus von 16 / 8 Stunden bei 20°C im zwei Liter-Schüttelkolben bei 120 U min⁻¹ im Inkubationsschüttler Multitron 2 (Infors HT, CH-Bottmingen) kultiviert.

Tabelle 4.3: Seawater Medium (= SWES "Seewasser + Erddekot + Salze")

Komponente	Stocklösung (g · L ⁻¹)	Nährlösungsanteil (mL)
KNO ₃	10	20
K ₂ HPO ₄	1	20
MgSO ₄ · 7 · H ₂ O	1	20
Erddekot (*)		30
Spurenelementelösung		5
Sterilfiltriertes ASW		905

Die Stocklösungen wurden bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Zugabe von sterilfiltriertem Vitamin B12 (5 µg) in die sterile Lösung erfolgte nach dem Abkühlen.

* Herstellung des Erddekots:

Mehrere 1 Liter Schottflaschen wurden zu einem Drittel des Volumens mit sandig-humoser Lauberde gefüllt, mit VE-Wasser überschichtet und zweimal im Abstand von 24 Stunden für eine Stunde auf 121° C erhitzt. Der Überstand wurde abdekantiert und verbleibende Partikel bzw. Feststoffe durch Zentrifugation (Varifuge, Heraeus Holding GmbH, D-63450 Hanau) bei 3000 g für 15 Minuten abgetrennt. Aliquote des Extraktes wurden in 250 mL Schott-Glasflaschen abge-

füllt und für 20 Minuten bei 121° C autoklaviert. Der Erddekot konnte nach dieser Behandlung über Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Tabelle 4.4: Spurenelementlösung

Komponente	Stocklösung (g · L ⁻¹)	Nährlösungsanteil (mL)
ZnSO ₄ · 7·H ₂ O	1	1
MnSO ₄ · 4·H ₂ O	1	2
H ₃ BO ₃	2	5
Co(NO ₃) ₂ · 6·H ₂ O	0,2	5
Na ₂ MoO ₄ · 2·H ₂ O	0,2	5
CuSO ₄ · 5·H ₂ O	0,005	1
VE-Wasser		981
FeSO ₄ · 7·H ₂ O		0,7 g
EDTA (Titriplex III, Merck)		0,8 g

Alle Komponenten wurden separat autoklaviert.

4.4.7 Meßmethoden zur Erfassung biologischer Stoffumsetzungen

4.4.7.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Die Sauerstoffsättigung in Wasser ist abhängig von Salzgehalt und Temperatur. Die Salinität in den Versuchsaquarien wurde durch Leitwertmesssonden kontinuierlich gemessen, mit VE-Wasser nachgeregelt und dadurch konstant auf einer Salinität von 36,4 ‰ gehalten. War dies nicht möglich, wurde die Salinität mit einem Messgerät gemessen (Portamess® 911 Cond, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, D-14134 Berlin) und in die Berechnungen einbezogen. Um die Temperaturkonstanz über den Versuchszeitraum zu gewährleisten, wurden die Versuche in Kleinf fermentern mit Temperiermantel (Artikelnummer 131500, Ochs GmbH, Glasgerätebau, D-37120 Bovenden/Lenglern) mit einem Volumen von 1800 mL durchgeführt.

Durch deren Kühlmantel wurde das Aquarienwasser sowie das Wasser der Durchlaufbecken in den Versuchsreihen in Kroatien über eine Aquarienpumpe mit einer Literleistung von $300 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ hindurchgepumpt. Dadurch wurde ein Temperatureinfluss auf die Messergebnisse als auch auf die Versuchsorganismen ausgeschlossen. Der Deckel war für die Aufnahme der Sauerstoffelektrode mit zwei GL25 Anschlüssen ausgestattet, einer zentriert, der zweite außermittig. Die Sauerstoffelektrode wurde zur bestmöglichen Anströmung in den außermittigen Anschluss mit einer Silikonabdichtung eingebaut. Der zweite Anschluss diente der Entlüftung der Versuchsapparatur und war aus diesem Grunde mittig an der höchsten Stelle des Deckels angebracht. Unter den Versuchsgefäßen befand sich jeweils ein Magnetrührer (Drehzahl $100 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$), der für die Durchmischung und Anströmung des Sauerstoffsensors sorgte. Die Versuchsschwämme wurden auf einem Lichtgitter aus Kunststoff platziert. Die Abnahme der Sauerstoffsättigung wurde durch einen IKS-Aquastar Aquariencomputer mit Temperaturkompensation durchgeführt. Der vollständige Versuchsaufbau mit Temperatursensor und Sauerstoffsensoren ist in Abbildung 4.6 zu sehen.



Abbildung 4.6: Versuchsaufbau zur Durchführung der Sauerstoffverbrauchsmessungen in Rovinj, Kroatien.

Vor jedem Versuchstag wurden die Sauerstoffsensoren gegen den umgebenden Luftdruck, Luft- und Wassertemperatur im Versuchsgefäß kalibriert. Der aktuelle Luftdruck wurde mit einem digitalen Barometer, die Umgebungstemperatur mit

einem digitalen Thermometer ermittelt, die Wassertemperatur mit einem Glaskthermometer überprüft.

Die Berechnung des Sauerstoffgehaltes erfolgte nach der Gleichung von Weiss (1970) unter Berücksichtigung der gemessenen Salinität und Temperatur in °C.

4.4.7.2 Photosynthese

Die Bruttphotosyntheserate BPR (Nettosauerstoffproduktion im Licht plus Atmungsrate im Dunkeln) wurde bei verschiedenen Beleuchtungsstärken bestimmt: vollständig abgedunkelt mit einer lichtundurchlässigen Kunststoffhülle, Beleuchtung mit Neonlicht oder im Schatten mit etwa $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Beleuchtung mit einem Tageslichtstrahler einer Beleuchtungsintensität von $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (TriLux 7981SD/HST HIT250K, TRILUX GmbH & Co. KG, D-59759 Arnsberg) und volles Sonnenlicht mit ungefähr $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Messungen erfolgten wie unter 4.4.7.1 beschrieben in geschlossenen Doppelmantelgefäßen.

4.4.8 Chemisch-analytische Methoden

4.4.8.1 Kohlenstoffanalytik

Die quantitative Bestimmung der organischen Kohlenstofffraktionen erfolgte auf der Grundlage der Umsetzung des gesamten organischen Kohlenstoffs (Total organic carbon = TOC) durch katalytische Oxidation zu Kohlendioxid (CO_2). Zur Differenzierung zwischen organischem (TOC) und anorganischem Kohlenstoff (Inorganic carbon = IC) wurde vor der Umsetzung der gesamte anorganische Kohlenstoff entfernt. Dies erfolgte über die Ansäuerung der Probe mit 2 N HCl auf pH 2, welches eine Verschiebung des Kalk-Kohlensäuregleichgewichtes zur Folge hatte, so dass der gesamte anorganische Kohlenstoff (Dissolved inorganic

carbon - DIC) in Form von gelöstem CO₂ vorlag. Durch Ausgasen der Probe mit synthetischer Luft wurde das so gebildete CO₂ ausgetrieben. Alle Proben wurden mit einem Shimadzu TOC-V_{CPN} inklusive Autosampler ASI-V mit externer Ausblaseinheit bearbeitet und gemessen. Hierbei kam der Standardkatalysator (Kugeln mit Platinbeschichtung) zum Einsatz, welcher im Gegensatz zum hochsensitiven Katalysator robuster gegenüber der Salzfracht ist. Die katalytische Verbrennung erfolgte bei 680°C unter synthetischer Luft. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 150 µL. Die salzhaltige Matrix bereitete dem Katalysator kein unmittelbares Problem. Ein Grund hierfür war die niedrig optimierte Verbrennungstemperatur, wodurch eine Salzschnmelze und somit der rasche Katalysatorverschleiß vermieden wurde. Dennoch machten kristalline Ablagerungen eine Katalysatorregeneration alle 200 Messungen erforderlich.

4.4.8.2 Vorbereitung der Probengefäße

Wegen der Empfindlichkeit des Gerätes und der zu erwarteten Konzentrationsbereiche der Proben im Bereich der Nachweisgrenze des Analysegerätes wurde den Probengefäßen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Diese müssen so beschaffen sein, dass Kontaminationen und Adsorptionen durch Bestandteile des Behältermaterials ausgeschlossen sind. Aus diesem Grunde wurden Glasgefäße von Shimadzu mit einem Gesamtvolumen von 25 mL verwendet. Vor Verwendung wurden diese für mindestens zwei Stunden zur Entfernung jeglicher Organik in einem Mucosalbad (1 %) (alkalischer Phosphatreiniger, Merz Consumer Care GmbH, D-60318 Frankfurt am Main, Artikel-Nr. 60442) eingelegt und anschließend dreimal mit VE-Wasser gespült.

4.4.8.3 Vorbereitung der Proben

Zur Analytik der Kohlenstoffgehalte wurden 20 mL der zu untersuchenden Wasser mit einer Spritze aufgezogen und direkt über einen 0,45 μm Filter in die Probengefäße (24 mL) filtriert (Rotilabo®-Spritzenfilter 0,45 μm , PVDF, Art. P667.1, Roth, D-76185 Karlsruhe).

Die TOC-Proben wurden unfiltriert in die Probengläser überführt und mit einem Rührfisch (\varnothing 3mm), Länge 8 mm, PTFE-ummantelt, Art. 0989.2, Roth, D-76185 Karlsruhe) bestückt, um die Sedimentation der partikulären Kohlenstofffraktionen zu verhindern. Die Ansäuerung der Proben auf einen pH-Wert von 2 erfolgte mit 3 Vol. % einer 2 N HCl.

4.4.8.4 Probenahme und Vorbereitung der Meerwasserproben aus der natürlichen Umgebung

Insgesamt standen 13 Proben zur NPOC-Messung (NPOC – non-purchaseable organic carbon) zur Verfügung. Im Detail handelte es sich um sechs Meerwasserproben (mit Salzsäure stabilisiert). Diese wurden aus unterschiedlichen Tiefen des Limski Kanals, dem Sammelgebiet der Schwämme, entnommen. Für die DOC-Messungen erfolgte direkt an Bord des Forschungsschiffes eine Filtration über einen 0,45 μm Filter. Die restlichen Proben waren Standardlösungen in rein wässriger sowie salzhaltiger Matrix zur Überprüfung ob relativ geringe NPOC-Werte mit einem TOC-V Gerät reproduzierbar messbar sind. Dabei sollte eine möglichst geringe Belastung des Systems erreicht werden. Bei den Meerwasserproben wurde infolge der Säurestabilisierung (0,18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) jeweils ein Blindwert abgezogen. Die NPOC-Werte liegen hier alle bei etwa 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ mit sehr guten Reproduzierbarkeiten. Es wurden keine Ausreißer gewertet.

Anhand der Testlösungen wird die Problematik von Blindwerten besonders deutlich, insbesondere durch das Hinzufügen von Salz. Im Bereich um 0,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ist die Reproduzierbarkeit geringer. Durch die Eliminierung eines Ausreißers erhält man jedoch wieder RSD-Werte von 2 - 3 %. Bei den NPOC-Messungen in dieser

Größenordnung sind Kontaminationen im Rahmen der Probenvorbereitung eher wahrscheinlich und somit von größerer Bedeutung.

Die salzhaltige Matrix bereitet dem Katalysator kein unmittelbares Problem. Ein Grund ist die niedrig optimierte Verbrennungstemperatur, wodurch eine Salzschnmelze und somit der rasche Katalysatorverschleiß vermieden wird. Dennoch machen kristalline Ablagerungen mit der Zeit eine Katalysatorregeneration erforderlich. Das Injektionsvolumen sollte unter Berücksichtigung der erforderlichen Bestimmungsgrenze von $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ auf ein Minimum reduziert werden. Ein Injektionsvolumen von $150 \mu\text{L}$ sollte aufgrund der hohen Salzfracht nicht überschritten werden.

4.4.8.5 Betriebsparameter

Die Steuerung des TOC-V CPH erfolgte über einen PC mit der TOC-Control V Software (Firmensoftware von Shimadzu). Die Grundeinstellungen für den Gasfluss der verwendeten synthetischen Luft (5.0, KW-frei) am Flaschenausgang betragen 5 bar, der Arbeitsdruck im Gerät 200 kPa. Der Fluss des Trägergases wurde auf $130 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ eingestellt. Die Proben wurden nach dem Ansäuern für drei Minuten ausgegast, um anorganisches CO_2 auszutreiben. Die Umsetzung der organischen Kohlenstofffraktionen zu CO_2 erfolgte durch katalytische Verbrennung der Probe bei $680 \text{ }^\circ\text{C}$ am Platinkatalysator. Störende Einflüsse der salzhaltigen Proben können durch Freisetzung von Halogenen während der Oxidation von Salzkomponenten am Katalysator entstehen. Diese wurden durch einen Halogen Scrubber, bestehend aus feinsten Kupferwolle (Halogen remover cartridge, Art. Nr.: 630-00992, Shimadzu, D-47269 Duisburg) durch Bildung von Kupferhalogeniden ausgeschlossen. Der Austausch des Halogen Scrubber erfolgte, wenn die Hälfte der Säule von außen sichtbar durch die Reaktion der Halogenide mit Kupfer schwarz verfärbt war. Durch die hohe Salzfracht musste trotz relativ geringer Katalysatortemperatur die entstehende Salzschnmelze nach 200 Messungen vom Katalysator entfernt werden. Der Katalysator wurde durch Waschen in 2 N HCl regeneriert.

4.4.8.6 Detektion

Die Bestimmung der entstandenen CO₂ Mengen wurde mittels Non Dispersive Infrarot-Detektion (NDIR) quantifiziert. Die Peakflächen wurden automatisch vom Gerät integriert. Diese wurden über die mit dem Standard erstellten Kalibriergeraden in die entsprechenden Ergebnisse umgerechnet. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5: Messparameter beim Shimadzu TOC-VCPN

Parameter	gewählte Größe
Injektionsvolumen	75 / 50 µL
zugegebene Säuremenge	2 %
Ausgaszeit	3 Minuten
Anzahl Injektionen für Mittelwert	3
min. Anzahl an Injektionen	3
max. Anzahl an Injektionen	5
max. Standardabweichung	0,1
max. Variationskoeffizient	2 %

4.4.8.7 Kalibrierung

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit einer Kaliumhydrogenphthalatlösung (99,5 %, Fluka 60359, M = 204,23 g · mol⁻¹, C₈H₅KO₄) für die zu erwartenden Konzentrationsbereiche. Die Verdünnungen wurden vor jeder Kalibrierung aus einer Standardstocklösung mit 1 g · L⁻¹ C (Einwaage 2,1274 g · L⁻¹) hergestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 NPOC-Messungen in der natürlichen Umgebung

Tabelle 5.1: Ergebnisse der NPOC-Messungen von Meerwasserproben aus dem Limski Kanal vom 11.05.2005 aus Tiefen zwischen fünf und 20 Meter.

Probenbezeichnung	NPOC ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD (%)
Limski 1 (TOC – 20 Meter)	1,13	3,7
Limski 2 (DOC – 20 Meter)	1,07	1,3
Limski 3 (TOC – 15 Meter)	0,98	1,2
Limski 4 (DOC – 15 Meter)	0,97	0,4
Limski 5 (TOC – 5 Meter)	0,96	0,7
Limski 6 (DOC – 5 Meter)	1,11	0,9
Milliporewasser	0,22	9,3
	0,21	3,0

Die Messwerte der Meerwasserproben lagen zwischen $0,96$ und $1,13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ für den TOC und $0,97$ und $1,11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ für den DOC. Diese liegen in der Größenordnung der in der Literatur zu findenden Werte von etwa $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ für den TOC und 95% dieses Wertes für den DOC (Yahel *et al.*, 2003). Konzentrationen mariner TOC-Werte betragen etwa $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, der Hauptanteil ($> 95 \%$) liegt als DOC vor. Der partikuläre Anteil ist kleiner als 5% , umgerechnet entspricht dies einem Wert von $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Kohlenstoff. Es wurde auch versucht, die über die Zellzahlmessungen ermittelten Filtrationsraten über Messungen des TOC zu verfolgen. Die Schwankungen in den Ergebnissen waren jedoch zu hoch, um eine Aussage treffen zu können. Dies kommt daher, dass für Zellzahlen in marinen Lebensräumen Konzentrationsbereiche in der Größenordnung von $1 - 5 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ vorliegen. Bei der Umrechnung in ihre Kohlenstoffäquivalente mit in vielen Veröffentlichungen zu findenden Werten für heterotrophe Bakterien von $20 \text{ fg C} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ (Ducklow *et al.* 1993) errechnen sich Kohlenstoffkonzentrationen von $2 - 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Diese liegen deutlich unter der Nachweisgrenze von $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ des TOC-Analysers und aller geeigneter Geräte am Markt.

5.2 Respirationsraten

Sauerstoffverbrauchsrate mariner Invertebraten sind temperaturabhängig und unterscheiden sich bei unterschiedlichen Schwammarten (Coma *et al.*, 2002). In den durchgeführten Messreihen wurden unterschiedliche Einflussfaktoren wie Temperatur, Kultivierungsdauer und Beleuchtungsintensität untersucht. Die Versuche wurden, wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. In Feldaufenthalten in Kroatien wurden diese mit unfiltriertem natürlichem Meerwasser durchgeführt, unter Laborbedingungen in Karlsruhe mit dem in den Aquarien verwendeten künstlichen Seewasser.

5.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Respirationsraten

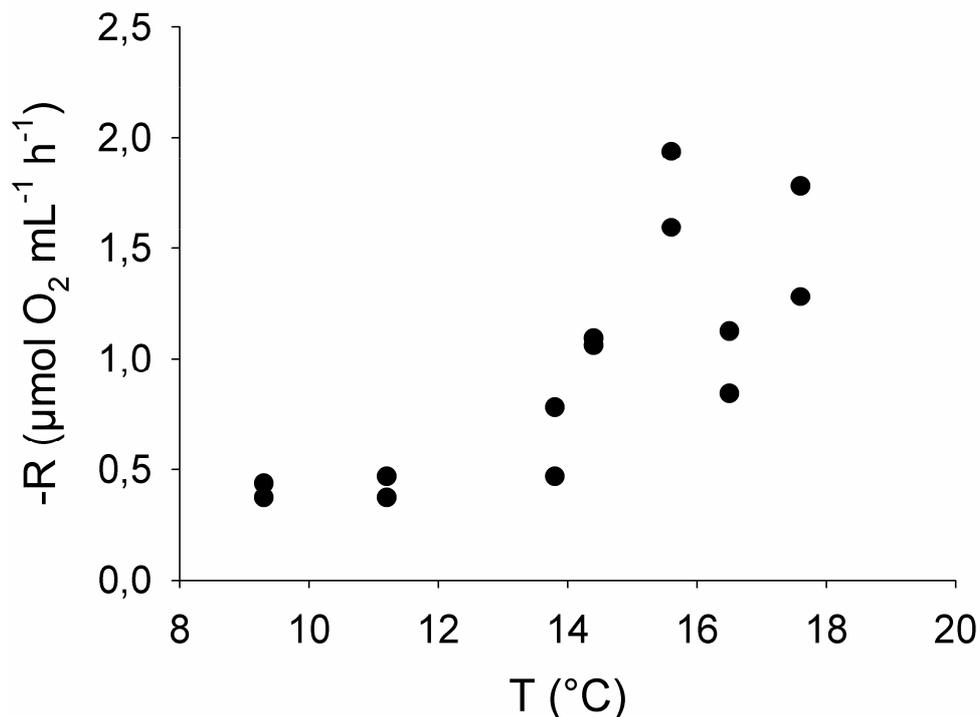


Abbildung 5.1: Respirationsrate (R) in Abhängigkeit der Temperatur (T) für *A. aerophoba* (n = 4).

Abbildung 5.1 zeigt die Respirationsraten für *A. aerophoba* in unfiltriertem natürlichem Meerwasser über den Temperaturbereich von 9 – 18 °C Wassertemperatur. Die Respirationsraten zeigen, wie erwartet, eine Zunahme mit steigender Temperatur. Die Werte steigen von $0,4 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 9,3 °C auf durchschnittliche Werte von $1,5 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei Wassertemperaturen von 17,6 °C.

5.2.2 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Respirationsraten

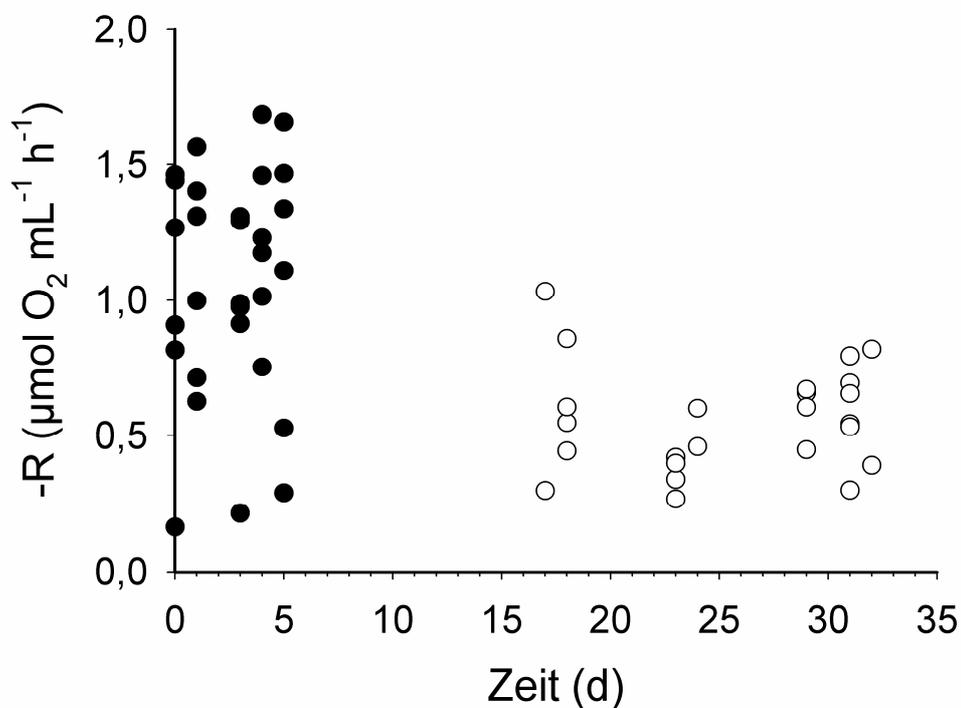


Abbildung 5.2: Sauerstoffverbrauchsrate (R) von *A. aerophoba* innerhalb eines Zeitraums von 30 Tagen. Schwarze Punkte ($T = 20.0 \text{ °C} - 22.4 \text{ °C}$), weiße Punkte ($T = 18.3 \text{ °C} \text{ to } 19.6 \text{ °C}$) ($n = 9$).

Abbildung 5.2 zeigt die Sauerstoffverbrauchsrate der frisch gesammelten Exemplare von *A. aerophoba* über den Kultivierungszeitraum unter Laborbedingungen. Die Messungen in Rovinj wurden in unfiltriertem natürlichem Meerwasser durchgeführt (schwarze Punkte). Die Werte für unter Laborbedingungen in ASW kultivierte Schwämme sind durch weiße Punkte gekennzeichnet. Die er-

mittelten Sauerstoffverbrauchsdaten für *A. aerophoba* lagen in Rovinj bei einer Wassertemperatur von 20,0 - 22,4 °C bei einem Durchschnittswert von $1,25 \pm 0,44 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff. Die Werte zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen, aber auch innerhalb verschiedener Messungen eines einzigen Individuums. Nach zwei Wochen unter Kultivierungsbedingungen im Labor sanken die durchschnittlichen Sauerstoffverbrauchsdaten bei *A. aerophoba* auf 50 % der Ursprungswerte ab. Die Messwerte betragen $0,63 \pm 0,22 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff bei einer Wassertemperatur zwischen 18,3 - 19,6 °C.

Die bestimmten Respirationsraten unter Dunkelbedingungen für *A. aerophoba* von 0,63 bis $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff sind mit denen von Henry Reiswig (1974b) vergleichbar, sie liegen in der Größenordnung von $0,89 \cdot 10^{-3}$ bis $3,03 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für drei Schwammarten der Demospongia aus der Karibik *Mycale* sp., *Tethya crypta* und *Verongia gigantea*. Die große Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Messungen erklärt sich vermutlich durch individuelle Unterschiede der einzelnen Individuen wie Vitalität und Pumpaktivität. Wie viele Schwammarten beherbergt auch *A. aerophoba* nicht nur eine große Zahl an Mikroorganismen, sondern er ist auch Lebensraum für Borstenwürmer (*Polychaeta*) und Schlangensterne (*Ophiuroidea*), die mit ihrem Stoffwechsel Einfluss auf die Messergebnisse haben können. Unterschiede innerhalb der Dunkelmessungen könnten sich auch alleine durch individuell unterschiedliche Konzentrationen an schwammassoziierten heterotrophen und autotrophen Mikroorganismen erklären lassen, da bei der Art *A. aerophoba* der Gehalt an der Gesamtbiomasse bis zu 40 % betragen kann.

5.2.3 Einfluss der Beleuchtungsintensität auf die Respirationsraten

A. aerophoba beherbergt im Pinacoderm photosynthetische Symbionten (Wilkinson *et al.*, 1981; Wehrl *et al.*, 2007). Es liegt daher nahe, dass diese Mikroorganismen unter Beleuchtung einen Einfluss auf die Sauerstoffverbrauchsmessungen und damit die Massenbilanz haben sollten. Der Einfluss dieser photosynthe-

tisch aktiven Symbionten auf die Gesamtrespirationsraten von *A. aerophoba* wurde in Abhängigkeit der Beleuchtungsintensität ermittelt.

Die Lichtmessungen (LI-COR Quantum Photometer Modell LI-250 Light Meter) ergaben für Messungen am 03. April 2007 um 10:20 Uhr vor dem Institutsgebäude bei klarem Himmel und direkter Sonneneinstrahlung einen Wert von $1100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

In der Abbildung 5.3 ist beispielhaft ein um die Kontrolle korrigierter tageszeitlicher Verlauf der Respirationsraten für zwei Individuen von *A. aerophoba* dargestellt. Zu Beginn der Messungen stand der Messaufbau im Schatten. Um 15:40 Uhr wanderte die Sonne aus dem Schatten des Hauses und beleuchtete mit voller Intensität die Versuchsgefäße. Diese Lichtintensität entspricht etwa $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Ein Anstieg der Sauerstoffsättigung war die Folge.

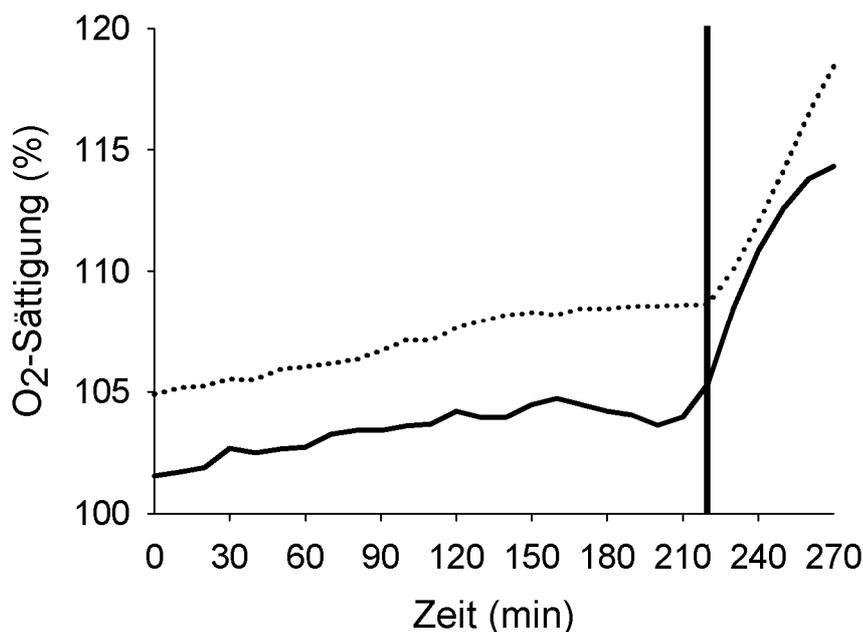


Abbildung 5.3: Verlauf des Sauerstoffverbrauch für *A. aerophoba* # 5 und # 12 in Abhängigkeit der Lichteinstrahlung (Versuch vom 25.04.2007). Die senkrechte Markierung zeigt den Zeitpunkt (15:40 Uhr) der vollen Sonneneinstrahlung auf die Versuchsgefäße.

Dieses Beispiel verdeutlicht den Einfluss der Beleuchtungsintensität auf die Sauerstoffsättigung in den Versuchsgefäßen und damit indirekt auf die Respirationsraten der Schwämme. Die darauf folgenden Versuche wurden mit vier verschiedenen Beleuchtungsintensitäten durchgeführt.

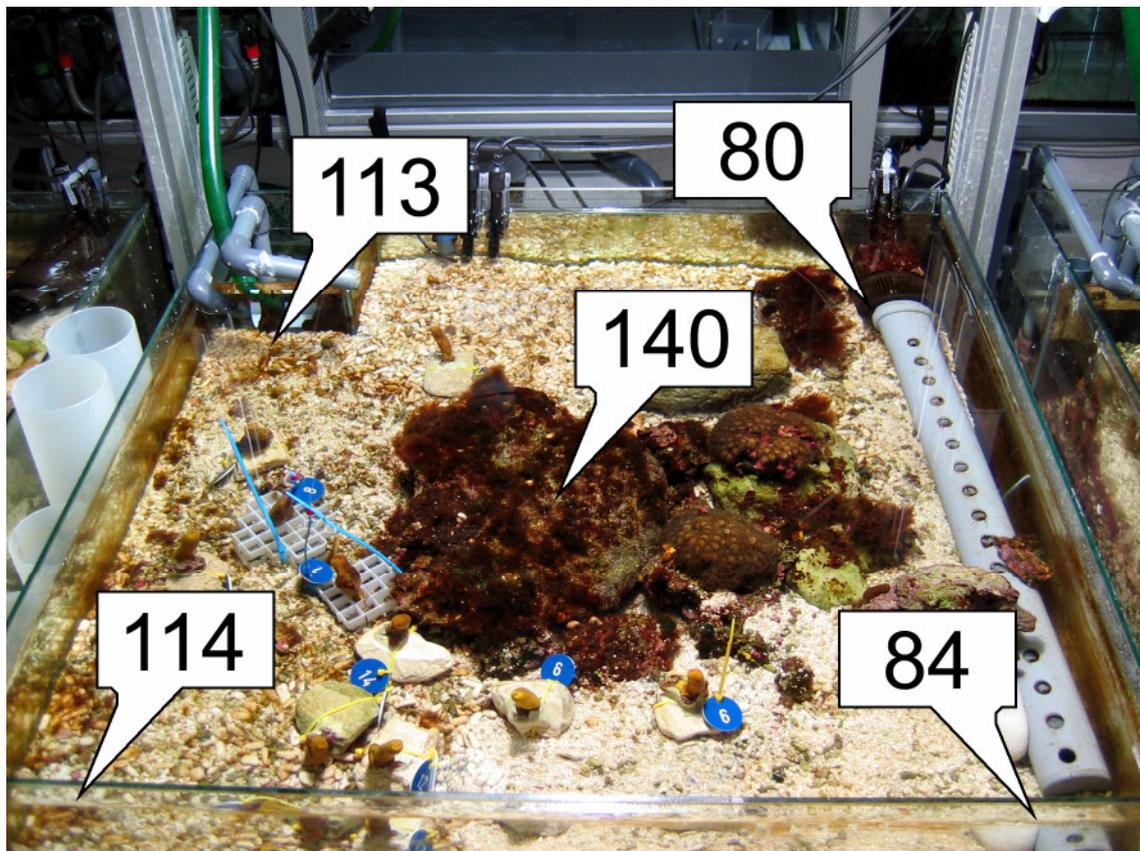


Abbildung 5.4: Messpunkte für die Lichtintensität an unterschiedlichen Punkten eines Aquarienmoduls bei Beleuchtung mit einer Trilux Hallenspiegelleuchte mit HQI-Brenner. Für die unter dieser Leuchte durchgeführten Messungen der Respirationsraten wurde mit einem durchschnittlichen Wert von $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gerechnet.

Die Respirationsraten von *A. aerophoba* sind offensichtlich durch die Anwesenheit der im corticalen Schwammgewebe assoziierten photosynthetisch aktiven Mikroorganismen von der Beleuchtungsintensität beeinflusst. Schwache Beleuchtungsintensitäten von $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ oder weniger führten zu einem Netto-Sauerstoffverbrauch. Bei höheren Beleuchtungsintensitäten zeigten die untersuchten Schwämme anstatt eines Sauerstoffverbrauches eine Sauerstoffproduktion.

Die Messergebnisse für die Respirationsraten von *A. aerophoba* in Abhängigkeit der Beleuchtungsintensität ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

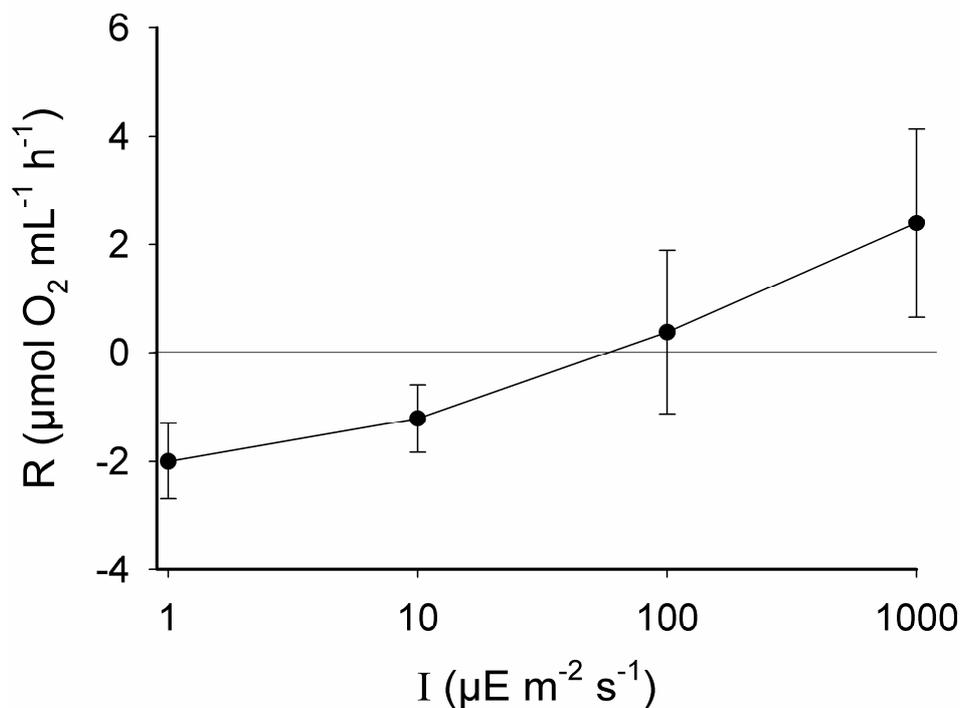


Abbildung 5.5: Respirationsraten (R) von *A. aerophoba* in Abhängigkeit der Beleuchtungsintensität (I).

Die Werte für Dunkelmessungen lagen bei $-1,62 \pm 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff, die für geringe Beleuchtung $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei $-1,21 \pm 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff. Lichtintensitäten von etwa $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ führten teilweise zu einem Sauerstoffverbrauch, während andere Individuen eine Sauerstoffproduktion aufwiesen.

Die Werte lagen im Mittel bei $3,8 \pm 15 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff. Ab Beleuchtungsintensitäten von etwa $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ zeigten alle untersuchten Schwämme eine Nettosauerstoffproduktion.

Die ermittelten Werte lagen bei $2,4 \pm 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff. Die beobachtete Sauerstoffproduktion kann wahrscheinlich der photosynthetischen Aktivität der im Gewebe von *A. aerophoba* beherbergten photosynthetischen Symbionten zugeordnet werden. Die Schwankungen unter beleuchteten Bedingungen sind möglicherweise analog der Dunkelmessungen durch eine unterschiedliche Dichte an symbiotischen Cyanobakterien im Exopinacoderm begründet, erkennbar durch unterschiedliche Färbung der einzelnen Individuen von hellgelb über orange bis hellbraun.

Die Schwämme der Art *A. aerophoba* zeigten eine Nettoprimärproduktion unter Belichtung. Die Werte lagen für eine Beleuchtungsstärke von $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ für die Sauerstoffproduktion durch Photosynthese zwei bis dreimal über den ermittelten Respirationsraten im Dunkeln. Bei einer Beleuchtungsstärke von $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ war die Sauerstoffproduktion durch die mikrobielle Photosynthese immer noch so hoch, dass sie die Massenbilanz von *A. aerophoba* ausgleichen konnte.

Dies stimmt mit Ergebnissen aus früheren *in-situ* Untersuchungen von Wilkinson und Vacelet (1979) überein. Die Untersuchungen zeigten beim Vergleich von Individuen der Art *A. aerophoba* unter *in-situ* Bedingungen, dass bei künstlicher Verdunkelung durch undurchsichtige Plastikfolien die Biomasse im Vergleich zu unbeschatteten Individuen ein 400 % niedriger war. Offensichtlich wird die Nahrungsversorgung in diesen Schwämmen durch die Versorgung der photosynthetisch aktiven Mikroorganismen mit gelösten organischen Verbindungen (Cheshire and Wilkinson, 1991; Wilkinson, 1983; Sará, 1971; Arillo *et al.*, 1993) und durch Stickstofffixierung (Diaz and Ward, 1997; Wilkinson and Fay, 1979) unterstützt. Andere Schwammarten gewinnen zusätzliche Nährstoffe durch Phagozytose und Verdau ihrer mikrobiellen Symbionten (Maldonado and Young, 1998). Der hemmende Einfluss von Lichtausschluss auf die Schwammsymbiose mit Cyanobakterien wurde von Robert W. Thacker (2005) für zwei Arten der Klasse der Demospongia beschrieben. Der Cyanobakterien beherbergende Schwamm *Lamellodysidea chlorea* verlor zum Beispiel mehr Biomasse unter Lichtmangel als die unbeschattete Kontrolle. Die fehlenden energiereichen Stoffwechselprodukte der Symbionten scheinen die Massenbilanz dieser

Schwammart negativ zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu zeigte die Beschattung von *Xestospongia exigua* ohne symbiotische Cyanobakterien keine signifikante Biomasseabnahme.

Cyanobakterien finden sich hauptsächlich im corticalen Schwammgewebe und verleihen *A. aerophoba* ihre charakteristische braune Färbung. Exemplare welche im Aquarium ausschließlich bei geringer Beleuchtung gehalten wurden, verloren ihre Cyanobakterien, gekennzeichnet durch eine blassgelbe Färbung. Möglicherweise unterliegen sie einem Stoffwechsellkollaps, ähnlich wie für *Chondrilla nucula* von Arillo *et al.* (1993) beschrieben. Untersuchungen von Wilkinson (1983) und Cheshire *et al.* (1997) zeigten, dass bis zu 50 % des Energiebudgets der Schwämme und 80 % des Kohlenstoffbedarfes durch die Photosyntheseaktivität ihrer mikrobiellen Symbionten gedeckt werden kann. Übereinstimmend mit diesen Arbeiten handelt es sich auch bei *A. aerophoba* um einen bakterienreichen Schwamm, welcher eine Nettosauerstoffproduktion bei hohen Beleuchtungsintensitäten zeigte. Diese ist ausreichend groß, um die unter Dunkelbedingungen ermittelten Respirationsraten zu decken.

Dennoch sind die bisher publizierten Daten noch nicht umfangreich genug, um quantitative Aussagen über den Einfluss der mikrobiellen Photosynthese machen zu können. Die ermittelten Werte für die Sauerstoffproduktion weisen darauf hin, dass der Einfluss der Beleuchtung auch in der natürlichen Umgebung einen erheblichen Einfluss auf die Massenbilanz von *A. aerophoba* geben muss. Es konnte gezeigt werden, dass die Beleuchtungsintensität ein Schlüsselfaktor zum Ausgleich der Massenbilanz von *A. aerophoba* ist. Daraus folgt, dass für jede biotechnologische Kultivierungsanlage eine ausreichend starke Beleuchtung grundlegend notwendig ist.

5.3 Bestimmung des Feuchtgewichtes, Trockengewichtes und aschefreien Trockengewichtes von *A. aerophoba*

Zur Abschätzung der zu erwartenden Biomasseabnahme auf Basis der Sauerstoffverbrauchsmessungen wurde das Verhältnis des Feuchtgewichtes (FG), Trockengewichtes (TG) und aschefreien Trockengewichtes (ash free dry weight - AFDW) ermittelt. Der aus den in Abbildung 5.6 dargestellten Messwerten ermittelte Umrechnungsfaktor für das Verhältnis von AFDW zu Biofeuchtmasse beträgt 7,25.

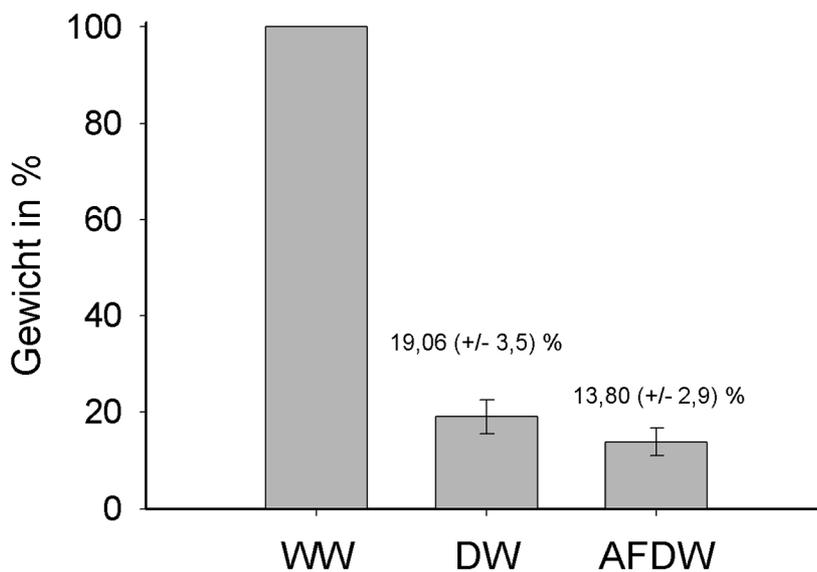


Abbildung 5.6: Zusammenhang zwischen Feuchtgewicht (WW), Trockenmasse (DW) und aschefreiem Trockengewicht (AFDW) des Modellorganismus *A. aerophoba* (prozentual aufgetragen).

5.4 Biomasseverlust über die Kultivierungsdauer

Die von Wilkinson und Vacelet (1979) unter natürlichen Bedingungen beobachtete Biomasseabnahme für *A. aerophoba* unter experimentell verschlechterten Bedingungen wie Abdunkelung durch lichtundurchlässige Folien und/oder fehlende Versorgung mit entsprechenden Futterpartikeln sollte unter künstlichen Bedingungen quantifiziert werden. Für ungefütterte Individuen wurde auf der Basis der experimentell bestimmten Sauerstoffverbrauchsrate ein Biomasseverlust über die Kultivierungsdauer kalkuliert.

Basierend auf den Messergebnissen für die Respirationsraten von *A. aerophoba* bei einer Temperatur von $19 \pm 0,7$ °C von $1,21 \pm 0,62 \cdot 10^{-4}$ mmol · mL⁻¹ · h⁻¹ Sauerstoff für eine Respirationsrate unter Dunkelbedingungen von 16 Stunden und für den Zeitraum von acht Stunden Neonlicht einer Intensität entsprechend $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ wurde eine durchschnittliche Respirationsrate von $1,62 \pm 0,70 \cdot 10^{-3}$ mmol · mL⁻¹ · h⁻¹ Sauerstoff als Berechnungsgrundlage genommen. Daraus resultiert eine prozentuale Abnahme von etwa 0,5 % Biofeuchtmasse pro Tag. Abbildung 5.7 zeigt die experimentell ermittelten und theoretisch erwarteten Werte für die Abnahme der Schwammbiomasse über den Zeitraum von 40 Tagen ohne Fütterung, aber mit Beleuchtung.

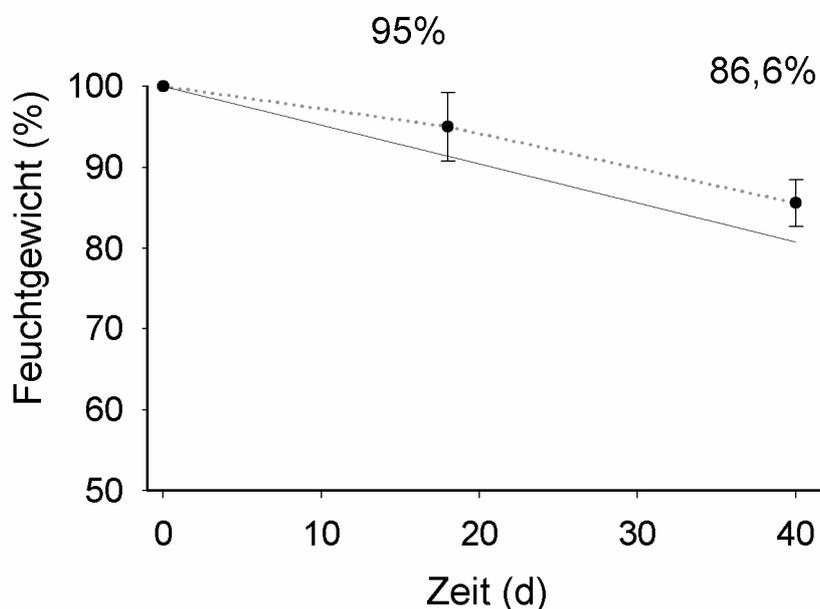


Abbildung 5.7: Gewichtsabnahme von *A. aerophoba* ($n = 8$) ohne Fütterung unter artifiziellen Bedingungen innerhalb eines Zeitraumes von 40 Tagen. Feuchtwicht standardisiert auf 100 %. Durchgezogene Linie: Theoretisch erwartete Abnahme. Punkte: experimentelle Ergebnisse, Mittelwert aus 8 Einzelmessungen an verschiedenen Schwämmen.

Die Schwämme zeigten eine Abnahme der Biofeuchtmasse (WW) zwischen 0,3 % und 0,4 % pro Tag. Entsprechende Werte der Biomasseabnahme wurden auch unter natürlichen Bedingungen beobachtet. Wilkinson und Vacelet (1979) berichten unter *in-situ* Bedingungen von einer Abnahme der Schwammbiomasse für die Art *A. aerophoba* unter ungünstigen Bedingungen. Wird auf der Basis dieser Ergebnisse mit einer Biomasseabnahme von 0,3 % pro Tag gerechnet, wie in Abbildung 5.7 dargestellt, so ergibt sich eine asymptotische Gewichtsabnahme über die Zeit.

Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der durchschnittlichen Sauerstoffverbrauchsrate der Dunkelmessungen für einen Zeitraum von 16 Stunden und der Sauerstoffverbrauchsrate unter Lichteinstrahlung für 8 Stunden mit der Arbeitsbeleuchtung mit einer Intensität von $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Daraus errechnet sich ein theoretischer Biomasseverlust von 0,5 % Biofeuchte-masse pro Tag. Diese theoretische Abnahme ist als durchgezogene Linie in Abbildung 5.7 aufgetragen. Am Ende der Experimente wurden Teile des Sponginskelettes sichtbar, welche auf den Rückgang von Schwammbiomasse zurückgeführt werden kann (Abbildung 5.8). Die Reduktion der Schwammbiomasse konnte damit quantitativ bestätigt werden.

Die Differenz zwischen berechneten und experimentell bestimmten Werten für die Biomassereduktion lassen sich dadurch erklären, dass das Schwammskelett aus Spongine nicht assimiliert werden kann. Eine Extrapolation der experimentell bestimmten Abnahmerate über ein Jahr würde bedeuten, dass bei *A. aerophoba* ohne ausreichende Fütterung eine Reduktion der Schwammbiomasse auf ein Drittel der ursprünglichen Menge zu erwarten wäre. Durch die Eigenschaft des undeterminierten Wachstums wird die Schwammbiomasse nicht vollständig absterben sondern das Schwammgewebe wird über die Zeit immer weiter reduziert. Diese Ergebnisse werden durch empirische Beobachtungen in den Versuchsaquarien gestützt und decken sich mit den empirischen Beobachtungen von Nickel (2001).



Abbildung 5.8: Linkes Foto: Kolonie von *A. aerophoba* mit weit geöffneten Oscula im natürlichen Lebensraum. Rechtes Foto: Durch mangelnde Nahrungsversorgung stark degeneriertes Individuum von *A. aerophoba* mit reduzierter Biomasse, zurückgebildeten Oscula und deutlich zu Tage tretendem Sponginskelett (Pfeile).

In den Versuchsaquarien war in jedem Fall eine Reduktion der Schwammbio-masse zu beobachten, dazu ein Verlust der Funktionalität durch Rückbildung der Oscula. Dennoch können auch nach zwei Jahren unter Steinen oder auf Substra-ten kleine gelbe Gewebereste von ehemaligen funktionellen Schwämmen gefun-den werden. Diese Fragmente können sich durch ihre Eigenschaft des undetermi-nierten Wachstums beim Eintreten günstigerer Bedingungen wieder zu funktio-nellen Schwämmen entwickeln (Sebens, 1987; Turon *et al.*, 1998). Dann bilden sie neue Oscula aus und sollten dann in der Lage sein, bei entsprechender Nah-rungspartikelversorgung zu wachsen (Hausmann *et al.*, 2006).

5.5 Partikelgrößenverteilungen der Futterpartikel

Als Futterpartikel wurden unterschiedliche Kulturen mariner Bakterien und Mik-roalgen verwendet. Die Abbildungen 5.9 bis 5.15 zeigen repräsentative Partikel-größenverteilungen für die einzelnen untersuchten Futterpartikel, die mit dem CASY[®] Cell Counter in künstlichem Meerwasser ermittelt wurden.

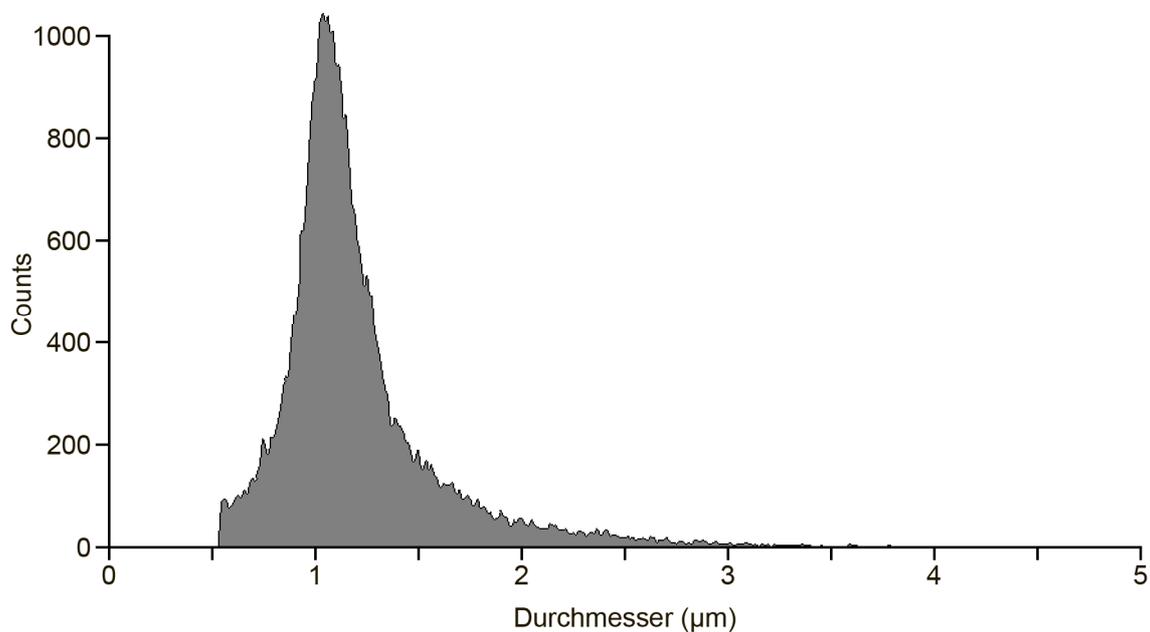


Abbildung 5.9: Partikelgrößenverteilung des marinen, kokkoiden Cyanobakteri-ums *Synechococcus* sp. WH 8102. Mittlerer Durchmesser 1,05 µm, Peakdurch-messer 0,95 µm.

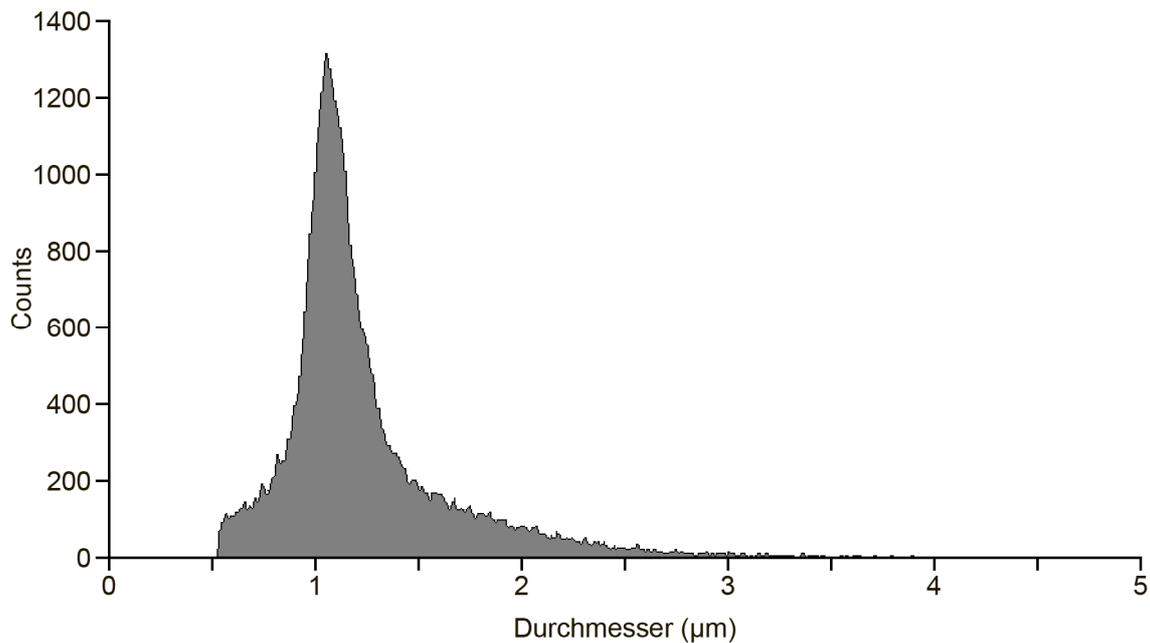


Abbildung 5.10: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums *Janibacter limosus* (Hel01), ein kokkoides, unbewegliches, aerobes, gram-positives Bakterium. Mittlerer Durchmesser 1,23 µm, Peakdurchmesser 1,07 µm.

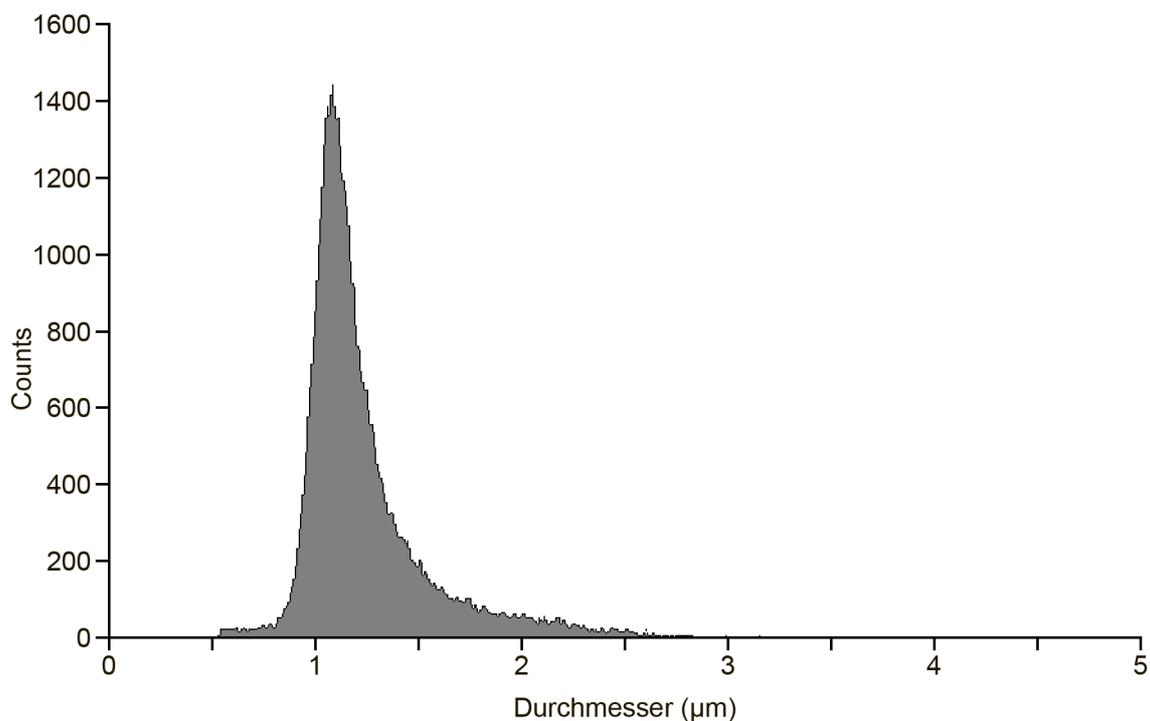


Abbildung 5.11: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums *Halomonas variabilis* Hel04, ein bewegliches, stäbchenförmiges, gram-positives Bakterium. Mittlerer Durchmesser 1,20 µm, Peakdurchmesser 1,04 µm.

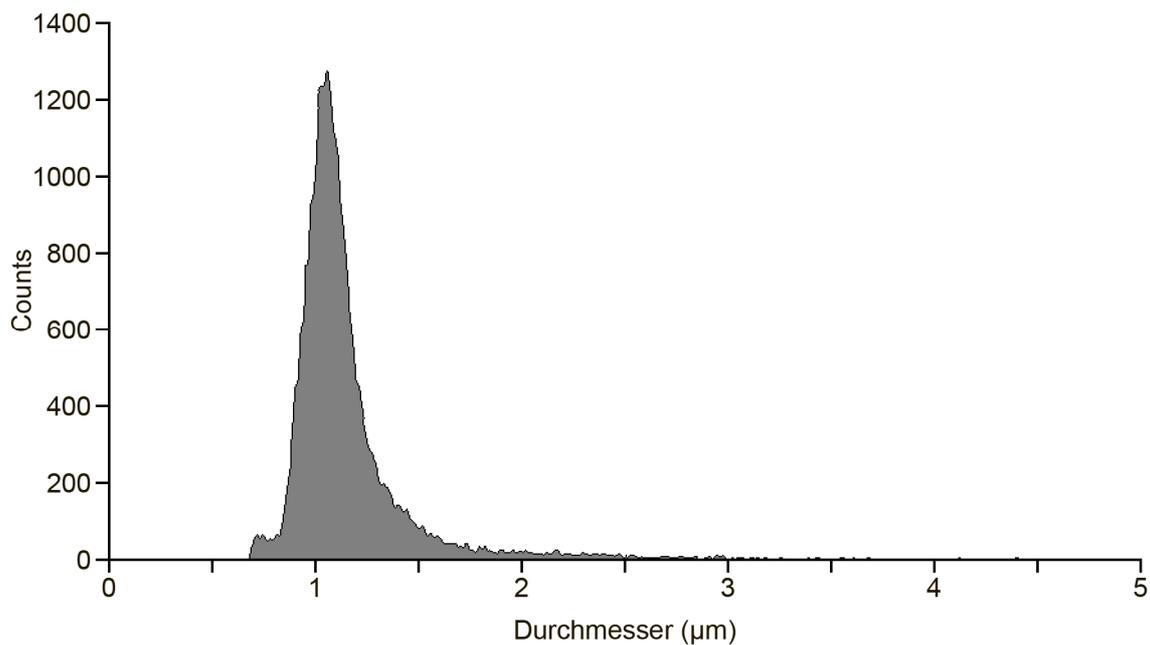


Abbildung 5.12: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums SB89. Mittlerer Durchmesser 1,01 µm, Peakdurchmesser 0,93 µm.

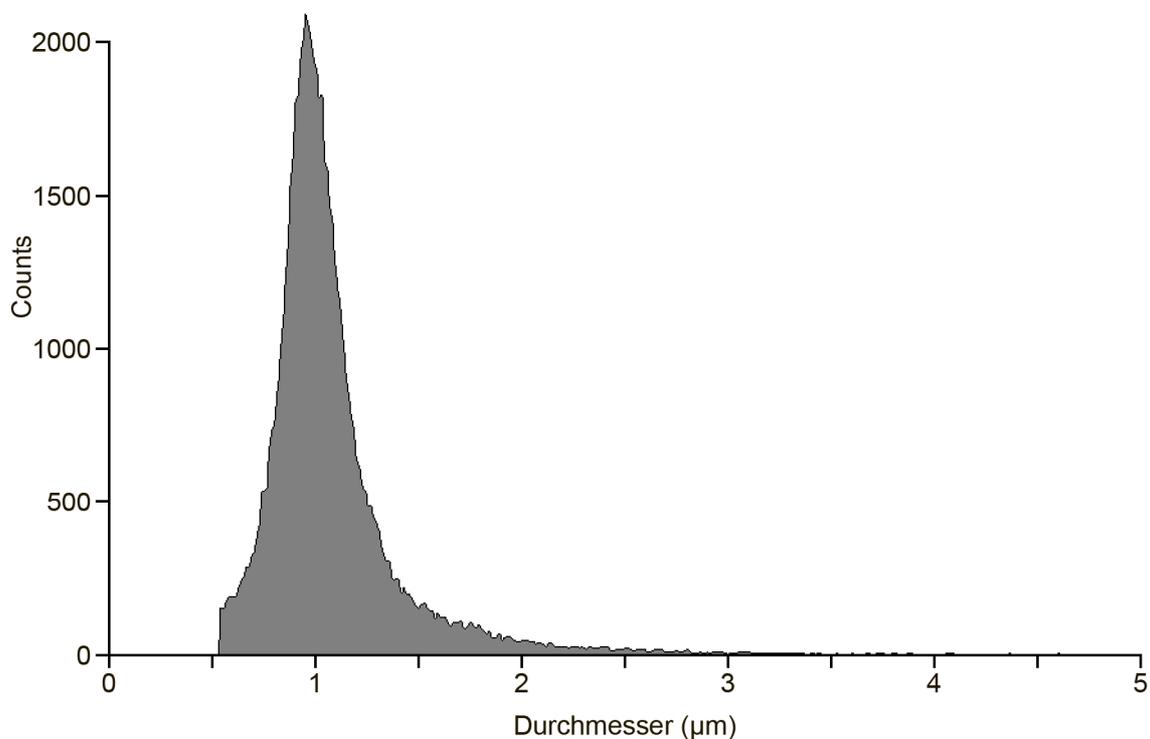


Abbildung 5.13: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums SB177. Mittlerer Durchmesser 1,21 µm, Peakdurchmesser 1,00 µm.

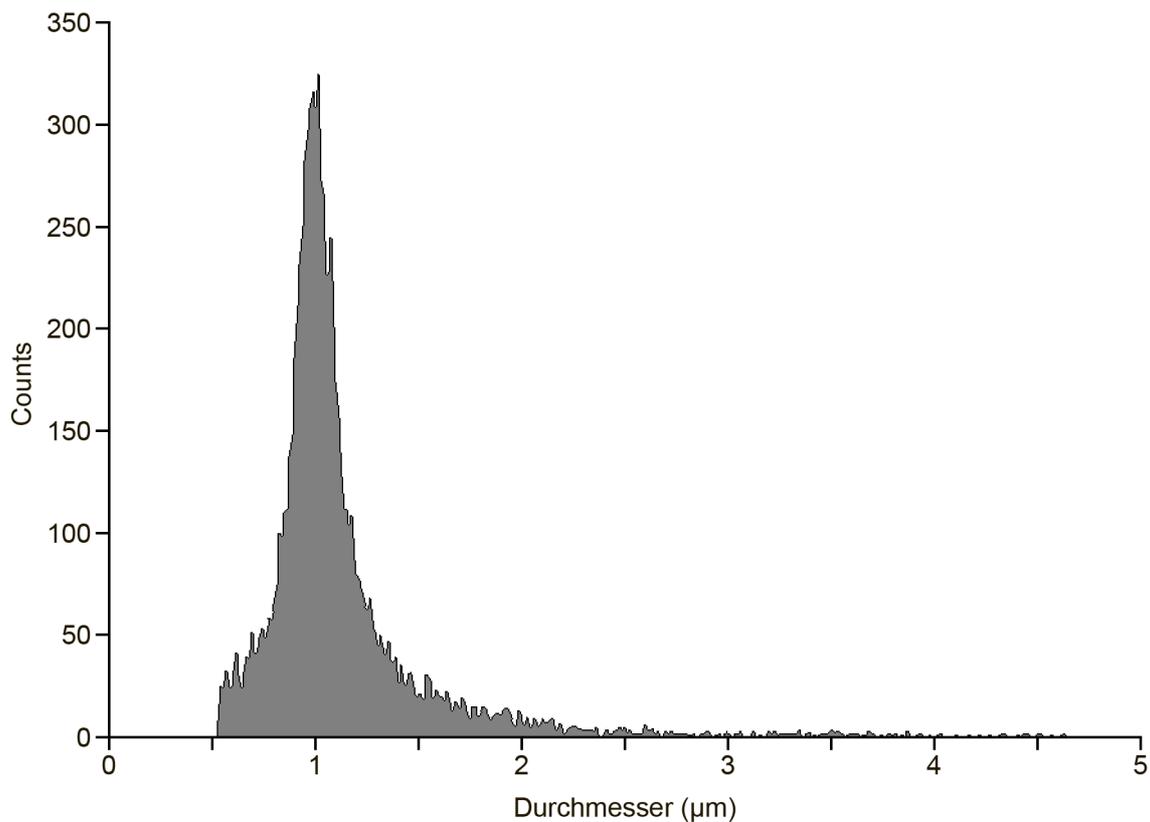


Abbildung 5.14: Partikelgrößenverteilung des verwendeten Futterpartikelgemisches aus *Janibacter limosus* Hel01, *Halomonas variabilis* Hel04, SB89 und SB177 sowie *Synechococcus* sp. WH 8102. Mittlerer Durchmesser 1,13 µm, Peakdurchmesser 1,00 µm.

Abbildung 5.14 zeigt die Partikelgrößenverteilung eines Gemisches aller verwendeten einzelligen Mikroorganismen nach Zugabe in eines der Aquarien. Der mittlere Durchmesser und der Peakdurchmesser liegen im gleichen Größenbereich wie die der Einzelmessungen für jedes Futterpartikel. Das Messergebnis zeigt, dass über den CASY[®] Cell Counter die Überprüfung der Zellzahlen in den Aquarien eine geeignete Methode darstellt. Die ermittelten Zellzahlen lassen sich eindeutig den zugegebenen Futterpartikeln zuordnen, da die Peakform denen der Einzelmessungen der jeweiligen Mikroorganismen in Form und Größenverteilung entspricht und keine störenden Peaks nach den Probenahmen aus den Versuchsaquarien festgestellt werden konnten.

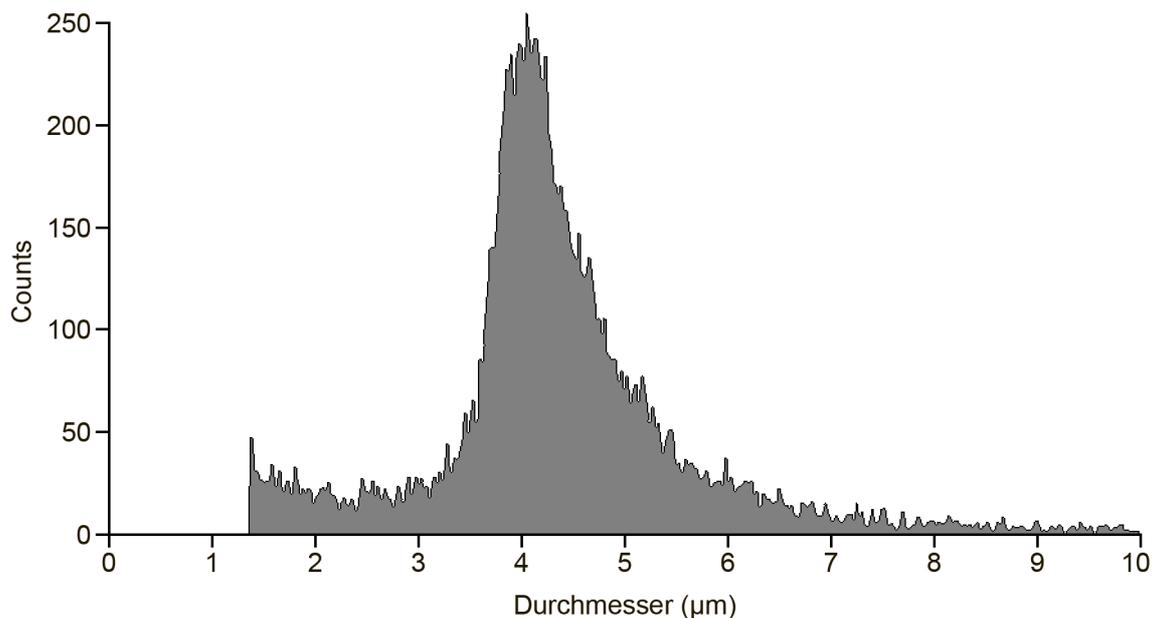


Abbildung 5.15 Partikelgrößenverteilung der marinen Mikroalge *P. tricornutum*. Mittlerer Durchmesser 4,36 µm, Peakdurchmesser 4,05 µm .

5.6 Ermittlung der Filtrationsraten

Bei einer kontinuierlichen Pumpaktivität des Schwammes und unter der Annahme, dass die Rückhalteraten des Schwammes für die gegebenen Partikelgrößen bei 100 % liegen, folgt die Partikelaufnahme einer einfachen exponentiellen Funktion ohne Grenzwertbildung. Die Partikelaufnahme eines Schwammes lässt sich bei einem definierten Volumen als Abnahme der Partikel über die Zeit nach folgender Gleichung beschreiben (Thomassen and Riisgård; 1995):

$$F = V_{\text{Wasser}} / V_{\text{Schwamm}} t^{-1} \ln(C_0/C_t)$$

in der F die Filtrationsrate, V_{Wasser} das Volumen des umgebenden Wassers in dem Versuchsgefäß ist, V_{Schwamm} ist das Volumen des Versuchschwammes, t ist der Versuchszeitraum, C_0 ist die Anfangskonzentration der Partikel und C_t ist die Konzentration der Partikel zum Zeitpunkt t .

5.6.1 Filtrationsversuche mit *Synechococcus* sp.

Unter Laborbedingungen wurden die Filtrationsraten mit dem Modellfütterpartikel *Synechococcus* sp. durchgeführt. Ziel war, die Nahrungsversorgungsstrategie zu optimieren und dafür die Zellkonzentration mit der höchsten Filtrationsrate zu ermitteln. Beginnend im Bereich der natürlichen Partikelkonzentration von etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL⁻¹ (Ribes *et al.*, 1999b) wurden die weiteren Konzentrationsbereiche bis zu einer Konzentrationen von $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹ getestet, die bei natürlichen Algenblüten auftreten können (Lynch and Phlips, 2000).

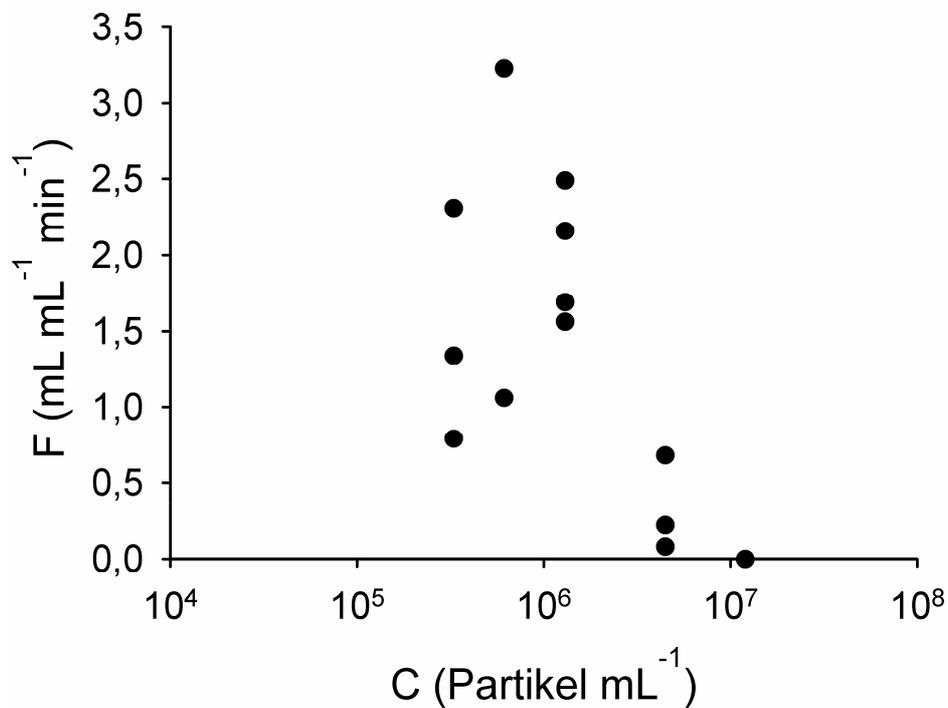


Abbildung 5.16: Partikelfiltrationsraten (F) für *A. aerophoba* bei verschiedenen *Synechococcus* sp. Konzentrationen (C).

Abbildung 5.16 zeigt die Partikelfiltrationsraten für *A. aerophoba* für *Synechococcus sp.* in Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen. Bis zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ steigt die Filtrationsrate von *A. aerophoba* an. Die maximal gemessene Filtrationsrate lag bei $3,4$ mL \cdot mL⁻¹ \cdot min⁻¹. Partikelkonzentrationen über $5 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ führten zu einem starkem Abfall der Filtrationsraten bis zur völligen Inaktivität der Versuchsschwämme bei Konzentrationen über $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹.

5.6.2 Filtrationsversuche mit *Phaeodactylum tricornutum*

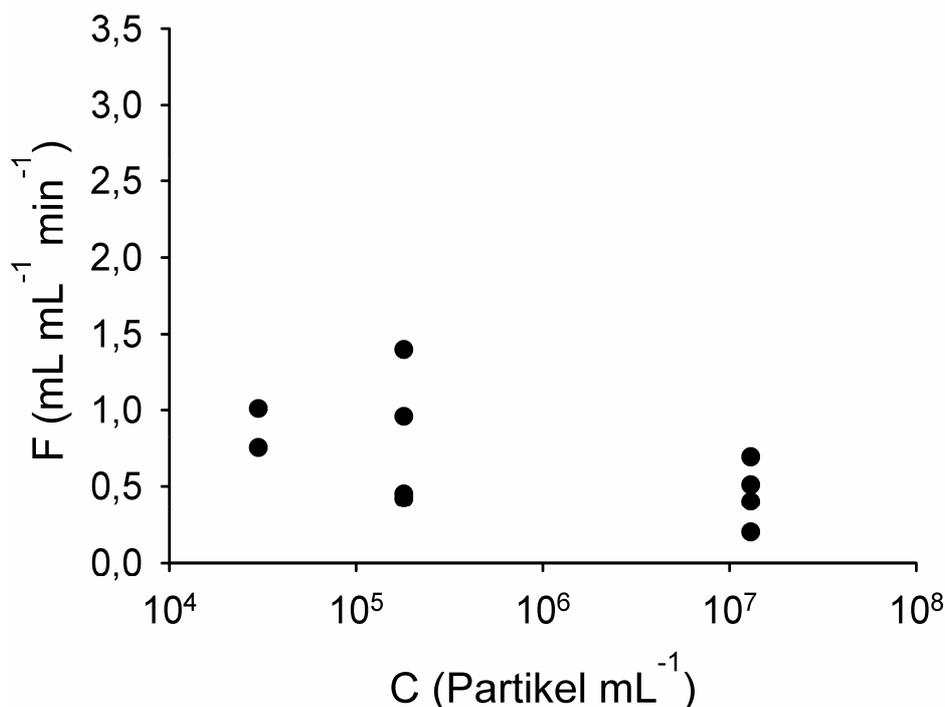


Abbildung 5.17: Partikelfiltrationsraten (F) für *A. aerophoba* bei verschiedenen *P. tricornutum* Konzentrationen.

Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten der Inhibierung der Filtrationsraten bei der Verwendung von *Synechococcus sp.* bei Konzentrationen über $1,8 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹, zeigten die Schwämme bei *P. tricornutum* Aktivität bis zu Kon-

zentration von $1,3 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹. Die maximal erreichten Filtrationsraten lagen mit einem Maximalwert von etwa $1,5 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei etwa der Hälfte der für *Synechococcus* sp. ermittelten Raten.

Die Abnahme der Filtrationsraten bei hohen Partikelkonzentrationen bei Verwendung von *Synechococcus* sp. sind übereinstimmend mit Untersuchungen von Frost and Williamson (1980) und Osinga *et al.* (2001). Frost bestimmte die Rückhalteraten für Hefezellen beim Süßwasserschwamm *Spongilla lacustris*, während Ronald Osinga *et al.* (2001) die Aufnahmeraten für den indopazifischen Hornschwamm *Pseudosuberites* aff. *andrewsi* unter Verwendung von *Synechococcus* sp. untersuchte.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Osinga *et al.* (2001), welche für größere Futterpartikel ab einer Konzentration von $4 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL⁻¹ eine reduzierte Filtrationsrate bewirkte, trat dieser Effekt bei der Verwendung von *P. tricornutum* erst ab Zellkonzentrationen über $4 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ auf. Frost und Williamson (1980) konnte keine Unterschiede zwischen den Filtrationsraten kleiner und großer Partikel im Größenbereich von 1 μ m über 3,9 bis 6,6 μ m Größe beim Süßwasserschwamm *S. lacustris in-situ* feststellen. Ein Anheben der Konzentrationen der verwendeten Hefezellen über zwei Zehnerpotenzen von $1,3 \cdot 10^4$ bis $1,7 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ führten zu einem annähernd 10-fachen Abfall der Filtrationsraten. Kowalke (2000) zeigte für Partikel größer 5 μ m maximale Rückhalteraten von über 70 % in den beiden antarktischen Schwammarten *Mycale acerata* und *Isodictya kerguelensis*.

Ein möglicher Mechanismus, durch den die Filtrationsleistung negativ beeinflusst werden könnte, ist die von der Arbeitsgruppe um Ute Hentschel beschriebene Fähigkeit der Schwämme, aufgenommene Futterpartikel zu unterscheiden (Wehrl *et al.*, 2007). Wehrl *et al.* (2007) bestimmte die Aufnahmerate von schwammassoziierten Bakterien, welche um annähernd zwei Zehnerpotenzen geringer war als die der Bakterien des umgebenden Seewassers. Dies wird durch die Hypothese von Wilkinson *et al.* (1984) gestützt, die besagt, dass marine Schwämme über eine selektive Partikelaufnahme verfügen.

Im Gegensatz dazu konnten bei Untersuchungen von Lynch und Phlips (2000) in der Florida Bay, U.S.A. keine negativen Effekte auf die Filtrationsraten dreier

Schwammarten bei einer Algenblüte von *Synechococcus* sp. festgestellt werden. Letztlich scheinen verschiedene Schwammarten spezifische Rückhalteraten für unterschiedliche Partikelgrößen zu besitzen.

5.7 Kohlenstoffaufnahmearten

Mit dem Durchmesser des Futterpartikels steigt deren Kohlenstoffgehalt in der dritten Potenz an. Zur Beurteilung der Massenbilanz ist der Zusammenhang zwischen Partikelkonzentration und dem spezifischen Kohlenstoffgehalt und der sich daraus errechnenden Kohlenstoffaufnahmeart aussagekräftiger. Abbildung 5.18 zeigt den Zusammenhang zwischen Partikelkonzentration (C) und der Kohlenstoffaufnahmeart ($F \cdot C_p$)

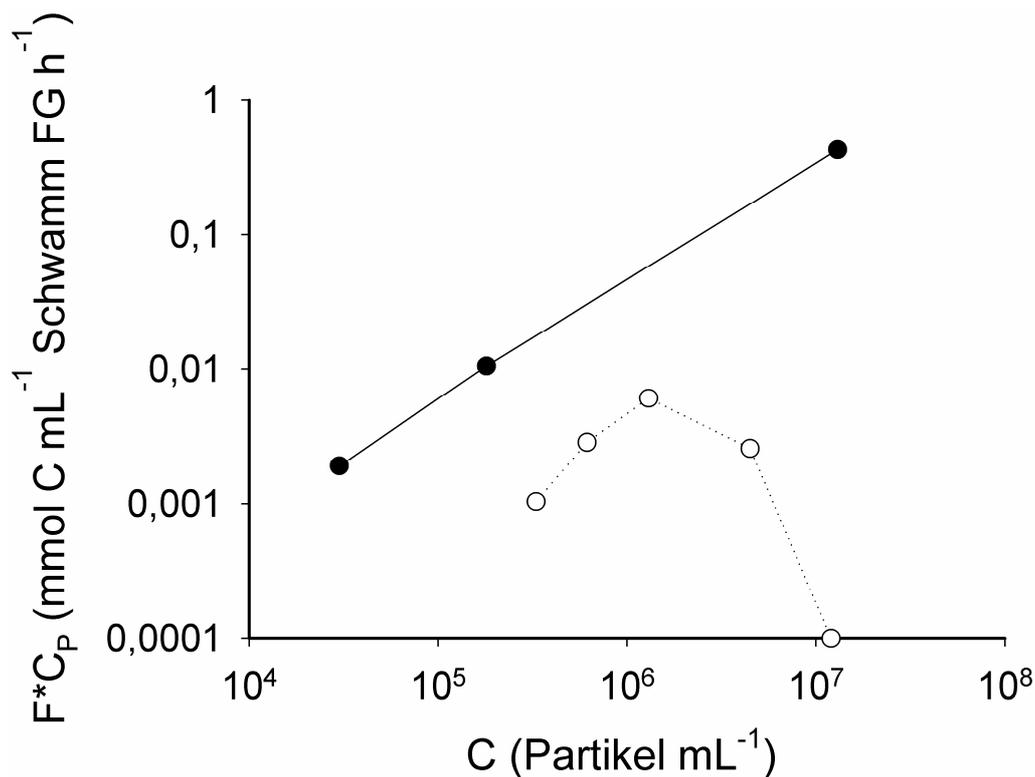


Abbildung 5.18 Kohlenstoffaufnahmearten ($F \cdot C_p$) von *A. aerophoba* in Abhängigkeit der Partikelkonzentrationen (C) von *Synechococcus* sp. (Weiße Punkte) und *P. tricornutum* (Schwarze Punkte). Mindestkohlenstoffmenge zur Deckung des Grundstoffwechsels als gestrichelte Linie dargestellt.

Bei der Verwendung von *Synechococcus* sp. wurde eine maximale Kohlenstoffaufnahme bei einer Konzentration von etwa $1,3 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ erreicht. Der berechnete Wert für die Kohlenstoffaufnahme lag bei $6 \mu\text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mL}^{-1}$ Schwammfeuchtgewicht pro Stunde. Höhere Zellkonzentrationen hemmten die Filtrationsaktivität der Schwämme. Dies führte bei Zellkonzentrationen über $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹ zu komplett inaktiven Schwämmen.

Diese Ergebnisse konnten bei der Verwendung von *P. tricornutum* nicht beobachtet werden. Obwohl die Filtrationsraten *Synechococcus* sp. im Vergleich zu *P. tricornutum* höher waren, ergaben sich für die resultierenden Kohlenstoffaufnahmeleistungen deutlich niedrigere Werte. Über den gesamten Konzentrationsbereich von $3,0 \cdot 10^4$ Zellen \cdot mL⁻¹ bis zur maximal eingesetzten Partikelkonzentration von $1,3 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹ zeigte sich, dass die Kohlenstoffaufnahmeleistungen kontinuierlich anstiegen. Eine maximale Kohlenstoffaufnahmeleistung wurde nicht erreicht, der höchste Wert für die Kohlenstoffaufnahmeleistung konnte für die höchste eingesetzte Zellkonzentration bestimmt werden. Die Kohlenstoffaufnahmeleistungen für *P. tricornutum* lagen bei allen Konzentrationsbereichen bis zu drei Zehnerpotenzen über denen der vergleichbaren Kohlenstoffaufnahmeleistungen für *Synechococcus* sp.. Der Maximalwert der Kohlenstoffaufnahmeleistung für *P. tricornutum* betrug $424 \mu\text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mL}^{-1}$ Schwammfeuchtgewicht pro Stunde.

Im Gegensatz dazu lagen die maximalen Kohlenstoffaufnahmeleistungen für *Synechococcus* sp. um zwei Zehnerpotenzen darunter. Basierend auf dem ermittelten Sauerstoffbedarf von $0,63 \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$ mmol \cdot mL⁻¹ \cdot h⁻¹ Sauerstoff bei Wassertemperaturen im Aquariensystem zwischen 18,3 - 19,6 °C ist in Abbildung 5.18 die Mindestkohlenstoffmenge zur Deckung des Grundstoffwechsels als gestrichelte Linie dargestellt. Für die Verwendung von *Synechococcus* sp. als alleinigen Nahrungspartikel und einem theoretischen Kohlenstoffgehalt von $470 \text{ fg C} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ (Campbell *et al.* 1994) wäre eine Versorgung der Schwämme mit $1,34 \pm 0,47 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL⁻¹ eingesetztem Schwammvolumen pro Stunde notwendig, um die Massenbilanz bei unbeleuchteten Bedingungen zu decken. Basierend auf einem theoretischen Schwammvolumen von 100 mL wären pro Tag $3,22 \pm 1,12 \cdot 10^8$ *Synechococcus* sp. Zellen notwendig.

Eine Fütterung mit *Synechococcus* sp. als alleiniger Kohlenstoffquelle ist bei *A. aerophoba* unter künstlichen Bedingungen möglich, aber nur in einem eng begrenzten Konzentrationsbereich.

Partikelkonzentrationen unter $1,34 \pm 0,47 \cdot 10^5$ Zellen · pro Milliliter eingesetztem Schwammvolumen pro Stunde reichen zur Deckung des Grundstoffwechsels aufgrund einer zu geringen Kohlenstoffaufnahme nicht aus. Konzentrationen über $1 \cdot 10^7$ Zellen · mL⁻¹ hemmen jedoch die Filtrationsleistung derart, dass eine ausreichende Versorgung des Schwammes mit partikulärer Nahrung aufgrund zu geringer Filtrationsraten ausgeschlossen ist. Die Fütterung mit *Synechococcus* deckt den Kohlenstoffbedarf nur in einem schmalen Konzentrationsbereich von etwa $5 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen · mL⁻¹. Im Gegensatz dazu resultiert die Fütterung bei gleicher Zellkonzentration mit *P. tricornutum* in einer 30-fach höheren Kohlenstoffaufnahme.

5.8 Schlussfolgerungen

Schwämme sind an niedrige Partikelkonzentration von etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen · mL⁻¹, die unter natürlichen Bedingungen vorkommen, angepasst. Sie können jedoch ihre Massenbilanz durch die Menge an Futterpartikeln im umgebenden Wasser nicht immer ausreichend decken. Durch ihre Eigenschaft des undeterminierten Wachstums können sie jedoch auf Perioden geringer Nahrungsverfügbarkeit reagieren und Teile ihrer Schwammbiomasse reduzieren (Turon *et al.*, 1998). Bei steigendem Nahrungsangebot sind Schwämme in der Lage wieder Biomasse aufzubauen. Die Idee, für Schwämme der Art *A. aerophoba* unter artifiziellen Bedingungen ein möglichst starkes Wachstum durch die Zugabe von möglichst hohen Konzentrationen an Futterpartikeln zu ermöglichen, stößt durch die damit verbundene Abnahme der Filtrationsraten an natürliche Grenzen.

Eine Methode zur Kalkulation der erforderlichen Konzentration an Nahrungspartikeln ist die Bestimmung der maximalen Kohlenstoffaufnahme eines gewählten Futterpartikels. Dieser muss über die gesamte Kultivierungsdauer aufrechterhalten werden, um ein Wachstum der Schwämme erwarten zu können. Voraussetzung dafür ist eine stabile Kultur zur Produktion entsprechend großer

Zellzahlen der gewünschten Futteralgen. Unter künstlichen Bedingungen ist marinem Phytoplankton den unter natürlichen Bedingungen als Hauptkohlenstofflieferant vorherrschenden Bakterien der Vorzug zu geben, da diese pro Zelle einen höheren Kohlenstoffgehalt aufweisen (Pile, 1997). Zusätzlich ist der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Sterolen höher, Nährstoffe die für das Wachstum bei marinen Invertebraten unentbehrlich zu sein scheinen (Phillips, 1984).

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden Grundlagen zur dauerhaften Kultivierung des Schwammes *A. aerophoba* erarbeitet. Für nachfolgende Arbeiten sind sie die Basis zur Kalkulation der entsprechenden Nahrungsmengen und das Einstellen entsprechender Beleuchtungsintensitäten um den Modellorganismus *A. aerophoba* über Zeiträume von mehreren Monaten ohne Verlust von Biomasse und Funktionalität zu kultivieren.

Die Schwierigkeiten bei der Arbeit mit den untersuchten Spezies von *A. aerophoba* lagen darin begründet, dass diese Schwammart keine kontinuierliche Filtrationsaktivität zeigte. Die Pumpaktivität war oft für mehrere Stunden und sogar Tage eingestellt. Bei diesen Phasen der Inaktivität konnten keine zeitlichen Rhythmen erkannt werden, sie verliefen in unregelmäßigen Zeitintervallen.

Als hemmende Effekte konnten hohe Futterpartikelkonzentrationen und zu starke Strömungsgeschwindigkeiten im Aquarium identifiziert werden. Es muss aber noch andere Ursachen für diese arhythmischen Aktivitäten der Schwämme geben, die noch nicht näher bestimmt werden konnten.

Diese Beobachtungen stimmen mit Publikationen von Henry Reiswig (1971a) überein. Er zeigte bei *in-situ* Untersuchungen von Pumpaktivitäten bei tropischen Demospongiae, dass die Zyklen zwischen aktiven und inaktiven Schwämmen nicht synchron verliefen. Dieses Phänomen konnte bei der gesamten untersuchten Population der Arten *Mycale* sp., *Verongia gigantea* und *Tethya crypta* beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen Umgebungsereignissen konnte nicht hergestellt werden (Reiswig, 1971a). Die periodischen Zyklen waren dabei innerhalb der untersuchten Population variabel, aber konstant für die Einzelindividuen. Diese Phänomene wurden auch *in-situ* am Süßwasserschwamm *Baika-*

lospongia bacillifera beobachtet und hängen zum Teil mit der Stärke der Umgebungsströmung zusammen (Savarese, 1997).

Alle in den Modulaquarien gehaltenen Schwämme der Art *A. aerophoba* zeigten bei Mangel an Futterpartikeln und ungenügenden Lichtverhältnissen innerhalb eines Zeitraumes von vier bis sechs Wochen so starke Degenerationserscheinungen, dass alle Oscula zurückgebildet wurden. Untersuchungen zur Ermittlung der Filtrationsleistungen waren deswegen nur in kurzen Zeiträumen nach dem Sammeln und dem Transport möglich.

Im Vergleich mit anderen Schwämmen zeigt *A. aerophoba* im Aquarium niedrige Filtrationsraten. Dies könnte durch die hohe Anzahl an assoziierten Mikroorganismen dieser Spezies begründet sein. Beim Vergleich unterschiedlicher Schwammspezies innerhalb eines Habitats wurde festgestellt, dass bakterienarme Schwämme charakteristischerweise hohe Pumpraten aufwiesen, während bakterienhaltige Spezies vergleichsweise niedrige Pumpraten zeigten (Reiswig, 1974b). Zusätzlich hat die Temperatur einen Einfluss auf die Pumpleistung (Riisgard *et al.*, 1993), so dass für Mittelmeerspezies, verglichen mit tropischen Vertretern, niedrigere Pumpraten erwartet werden müssen. Ferner spielen ökologische Faktoren des Habitats eine Rolle. Zur Deckung der Massenbilanz muss eine bestimmte Anzahl von Nahrungspartikeln filtrierte werden. Der Planktongehalt des Mittelmeers übersteigt den der tropischen Riffe um ein mehrfaches (Wilkinson, 1987). Mediterrane Vertreter können ihre Massenbilanz somit aus einem wesentlich geringeren Seewasservolumen decken.

Schlussendlich bleibt zu beweisen, dass die qualitativen Futterbedürfnisse mit *P. tricornutum* als Futterorganismus erfüllt werden können.

Zur weiteren Diskussion der Ergebnisse wären für folgende Projekte *in-situ* Untersuchungen zur Ermittlung der Filtrationsraten denkbar. Diese könnten im Vergleich mit unter *ex-situ* Bedingungen ermittelten Filtrationsraten ein Maß zur Beurteilung der Vitalitätszustände der Schwämme darstellen und bei der Optimierung qualitativer Parameter helfen.

6 Ausblick

Die Basisparameter der Schwammkultivierung in Aquarien sind Temperatur, Licht, Strömung sowie qualitative und quantitative Futteranforderungen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei *A. aerophoba*, wie erwartet, ohne Zugabe von adäquaten Futterpartikeln aber auch ohne ausreichende Beleuchtungsintensität ein starker Biomasseverlust eintritt. Er verliert seine Fähigkeit, die angebotenen Futterpartikel aufzunehmen. Für eine dauerhafte Kultivierung ist es unumgänglich, vor dem Einbringen der Versuchsschwämme ein funktionierendes System zur Versorgung mit Nahrungspartikeln zu etablieren.

In dieser Arbeit wurden die grundlegenden quantitativen Fragen zur Auslegung eines solchen Systems durch die Bestimmung der Respirationsraten für *A. aerophoba* und dessen Filtrationsraten für zwei Modellfutterpartikel untersucht.

Ein nächster sinnvoller Schritt wäre der Ausbau der Anlage um eine Algenkultivierungseinheit, welche eine kontinuierliche Versorgung der Schwämme mit Futterpartikeln ermöglichen würde. Im Folgenden soll der Ausbau der Aquarienanlage mit einer kontinuierlichen Fütterung über einen Algenreaktor betrachtet werden. Die ermittelten Ergebnisse dienen als Berechnungsgrundlage für die Auslegung eines Photobioreaktors.

Zur Veranschaulichung sollen die benötigten Zellzahlen für die Futterpartikel an einem Beispiel kalkuliert werden. Die Abbildung 6.1 zeigt ein Modulbecken mit etwa 20 Schwammkolonien der Art *A. aerophoba*. Exemplarisch soll anhand dieses, auf 1000 mL geschätztes, Schwammvolumina die Auslegung eines künftigen Algenreaktors kalkuliert werden.

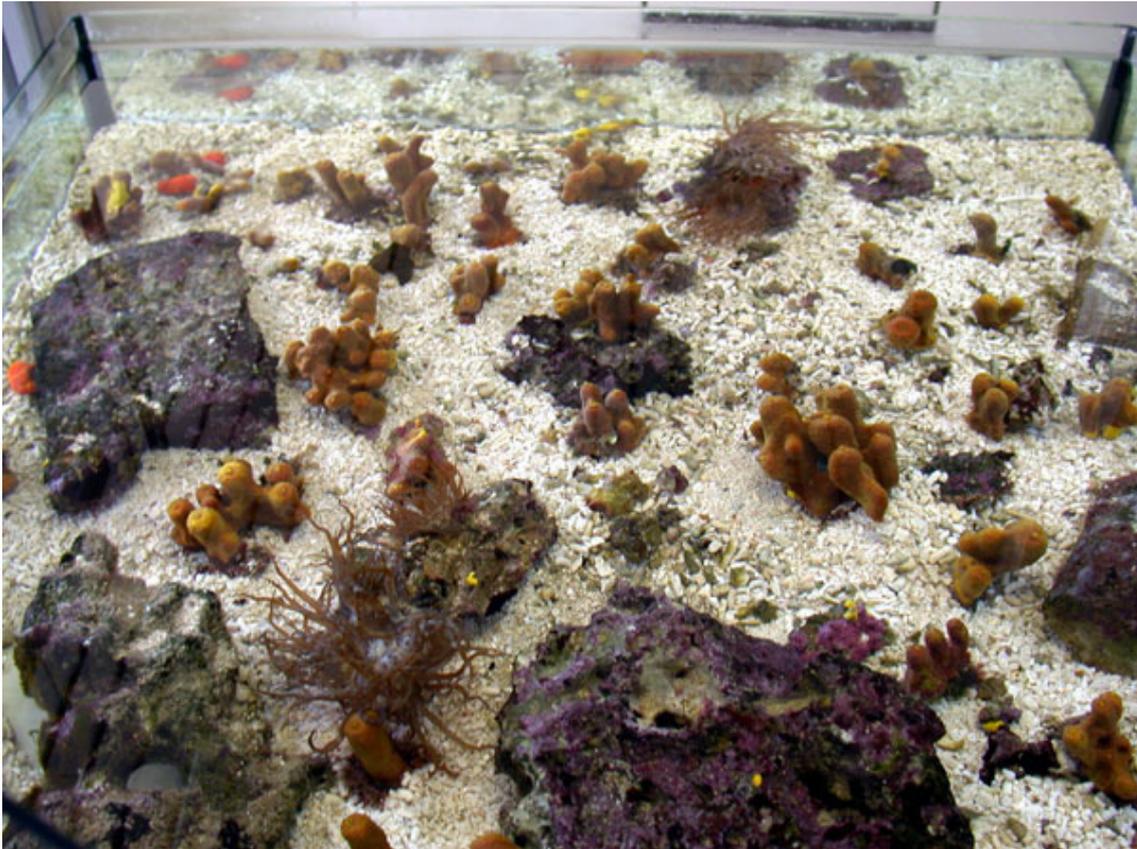


Abbildung 6.1: Eines der Modulbecken der Schwammzuchtanlage mit 100 Liter Inhalt. Besetzt mit etwa 20 frisch gesammelten Kolonien der Art *A. aerophoba*. Geschätztes Gesamtbiovolumen der Schwämme von 1000 mL.

Zur Kalkulation der erforderlichen Menge an *P. tricornutum* Zellen wurde die Ergebnisse dieser Arbeit zur Grunde gelegt.

Die minimal erforderliche Futterpartikelkonzentration zur Deckung des täglichen Grundumsatzes von einem Liter Schwammbiovolumen von *A. aerophoba* bei einer Respirationsrate $R = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff und einer Kultivierungstemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ sind in Tabelle 6.1 für unterschiedliche in der Arbeit verwendete Futterpartikel zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Berechnete minimale Futterpartikelkonzentration zur Deckung des täglichen Grundumsatzes von 1000 mL Schwammbiovolumen des Schwammes *A. aerophoba* für $R = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff bei einer Wassertemperatur von 20°C.

Futterpartikel	Durchmesser (μm)	C-Gehalt des Futterpartikels ($\text{pg C} \cdot \text{Zelle}^{-1}$)	Benötigte Futterpartikelzahlen pro Tag
<i>P. tricornutum</i>	5	14,5 (Strathmann, 1967)	$1,99 \cdot 10^{10}$
<i>Synechococcus</i> sp.	1	0,47 (Campbell <i>et al.</i> 1994)	$6,13 \cdot 10^{11}$
Heterotrophe Bakterien	1	0,02 (Ducklow <i>et al.</i> , 1993)	$1,44 \cdot 10^{13}$

Der Kohlenstoffgehalt der *P. tricornutum* Zellen ist um den Faktor 725 höher als die der marinen heterotrophen Bakterien und erklärt sich durch das größere Zellvolumen. Da das Zellvolumen aber nur das 60-fache über dem der Bakterien liegt, sind wahrscheinlich Speicherstoffe in den Zellen eingelagert, wie sie auch in *Synechococcus* sp. Zellen nachgewiesen wurden (Levi und Preiss, 1976). Dies erklärt auch den um den Faktor 20 größeren Kohlenstoffgehalt der *Synechococcus* Zellen gegenüber den heterotrophen Bakterien mit gleichem Zellvolumen, ausgehend von einer kugelförmigen Zellform.

Im Allgemeinen führen überhöhte Konzentrationen an Algen und Bakterien zu einer Reduktion der Filtrationsaktivität von Schwämmen. Die von Osinga *et al.* (2001) beobachtete Abnahme der Filtrationsaktivität des Schwammes *Pseudosuberites* aff. *andrewsi* durch Blockierung des aquiferen Kanalsystems bei Gabe größerer Futterpartikel von 4 – 10 μm Durchmesser konnte für *A. aerophoba* bei Verwendung von *P. tricornutum* von etwa 5 μm Durchmesser nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte diese Futteralge im Vergleich mit der kleineren und ubiquitär verbreiteten Blaualge *Synechococcus* sp. mit 1 μm Durchmesser eine maximal Kohlenstoffaufnahme bei einer Konzentration von etwa $1 \cdot 10^7$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$.

Für zukünftige Untersuchungen scheint die dauerhafte Kultivierung und Biomassezunahme bei *A. aerophoba* bei der Verwendung von *P. tricornutum* als einzigem Futterpartikel vielversprechend. Die Schwämme zeigten noch Filtrieraktivität bis zu einer Konzentration von $1,3 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL⁻¹. Der erreichte Maximalwert für die Filtrationsraten von etwa $3,4$ mL \cdot mL⁻¹ \cdot min⁻¹ wurde schon bei Zellkonzentration von etwa $3 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL⁻¹ *P. tricornutum* erreicht.

Bei einer einmaligen Zudosierung der Futterpartikel resultiert eine hohe Zellkonzentration im Wasser die, wie gezeigt werden konnte, zum Einstellen der Pumpaktivität der Schwämme führt, eine partikuläre Nahrungsaufnahme ist nicht möglich. Eine Lösung ist die kontinuierliche Zudosierung von Futterpartikeln, wie sie grafisch in Abbildung 6.2 dargestellt ist.

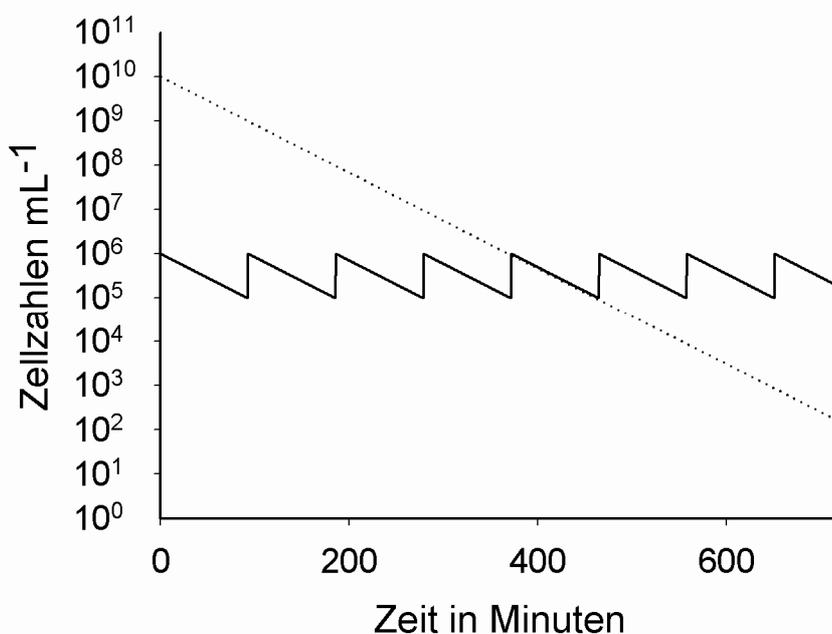


Abbildung 6.2: Simulierter Verlauf einer quasi-kontinuierlichen Fütterung (durchgezogene Linie) und einer einmaligen Zudosierung (gepunktete Linie) der Futterpartikelmenge über einen Zeitraum von zwölf Stunden, Darstellung halb-logarithmisch.

Bei Verwendung von Harnstoff als Stickstoffquelle gibt Meiser *et al.* (2004) beim Einsatz eines Plattenphotobioreaktors eine Ausbeute für *P. tricornutum* von

$2,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ an (Begasungsrate 0,66 vvm, Beleuchtungsdauer 24 Stunden pro Tag, Lichtintensität $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Unter den gegebenen Laborbedingungen scheint die Umsetzung, wie sie von Fernandez *et al.* (2003) für die Produktion von *P. tricornutum* in einem helicalen Reaktor beschrieben wurde, praktikabler. Aus diesem Grunde wird für die Kalkulation der benötigten Futterpartikel die dort angegebene Ausbeute von $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ verwendet.

Bei einer Ausbeute von $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ *P. tricornutum* und einem Durchmesser von $5 \mu\text{m}$ pro Zelle sowie einer Zelldichte von geschätzten $1,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ergeben sich pro Liter und Tag $2 \cdot 10^{10}$ Zellen absolut. Die bestimmten Respirationsraten für *A. aerophoba* liegen in der Größenordnung von $1 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff und sind vergleichbar mit denen von Reiswig (1974b) für karibische Schwämme ermittelten Werte von 0,9 bis $3,0 \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff. Die sich daraus über die Kohlenstoffäquivalente nach Strathmann (1967) von $14,5 \text{ pg C} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ errechnete Zellzahl für ein theoretisches Schwammvolumen von 1000 mL pro Tag ergibt eine Zellzahl von $2 \cdot 10^{10}$ Zellen.

Für die Deckung des Grundumsatzes wäre entsprechend ein Photobioreaktor von einem Liter Volumen ausreichend. Werden jedoch alle in der Anlage verwendeten Aquarien und die darin enthaltene zehnfache Biomasse berücksichtigt und soll nicht nur der Grundumsatz gedeckt, sondern auch Wachstum bei Schwämmen möglich sein, so empfiehlt sich, das Gesamtvolumen des Photobioreaktors um den Faktor 30 auf 30 Liter zu erhöhen. Da die Kultivierungszyklen begrenzt sind bzw. auch Reinigungszyklen für die Reaktoren eingeplant werden müssen, sollte dieses System redundant ausgelegt sein.

Die Beleuchtung scheint ein wichtiger Schlüsselfaktor für die Kultivierung des Schwammes *A. aerophoba* zu sein.

Es konnte gezeigt werden, dass die Photosyntheseleistung der assoziierten Mikroorganismen einen entscheidenden Anteil zur Massenbilanz dieser Schwammart beiträgt und über die Beleuchtung durch die eingesetzten Halogenstrahler mit einer Beleuchtungsintensität von $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gedeckt werden kann.

Ein weiterer Ansatz für die Kultivierung von *A. aerophoba* wäre eine 24-stündige Beleuchtung pro Tag mit den verwendeten Halogenstrahler durchzuführen

und zu überprüfen, ob eine dauerhafte indirekte Versorgung der Schwämme über deren assoziierte photosynthetische Symbionten möglich sein könnte. Dies sollte im Gegensatz zu bakterienarmen Schwammspezies möglich sein und besitzt den Vorteil, dass die Belastung des Aquarienwassers durch nicht aufgenommene Nahrungspartikel vermieden wird.

Vorstellbar wären auch vergleichende Versuche mit den bestehenden vier Modulbecken, bei dem der Versuchsaufbau so gewählt wird, dass bei einem Modul eine Dauerbeleuchtung plus Futtermittellversorgung, ein Modul mit Dauerbeleuchtung ohne Futtermittellversorgung, ein Modul ohne Beleuchtung plus Futtermittellversorgung und ein Modulbecken zur Kontrolle ohne Beleuchtung und ohne Futtermittellversorgung installiert wird. Aufgrund der zu erwartenden geringen Biomassezuwachsrate für Schwämme, die für *A. aerophoba* unter natürlichen Bedingungen in der Größenordnung von 80 % innerhalb eines Zeitraumes von 47 Wochen lag (Wilkinson and Vacelet, 1979), sollte ein Versuchszeitraum von mindestens zwölf Monaten veranschlagt werden, um eine nachweisliche Zunahme der Biomasse erwarten zu können.

7 Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner als
±	plus / minus
%	Prozent
‰	Promille
AFDM	ash free dry mass
AFDW	ash free dry weight
ASW	artificial seawater (synthetisches Seewasser)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius, Temperatur (SI-Einheit)
C ₀	Anfangspartikelkonzentration
C _p	Kohlenstoffgehalt eines Futterpartikels
Cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DIC	dissolved inorganic carbon
DOC	dissolved organic carbon
DM	dry mass
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DW	dry weight
E	Einstein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	„ <i>et altera</i> “: und weitere
EtOH	Ethanol
<i>ex situ</i>	(lat.: außerhalb des (Ursprungs-) Ort)
F	Filtrationsrate
FG	Feuchtgewicht
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HQI-Strahler	Hochdruck-Quecksilber-Dampf-Strahler
I	Beleuchtungsintensität
IC	inorganic carbon
<i>in situ</i>	(lat.: am (Ursprungs-) Ort)
IR	Infrarot
Kat.	Katalysator
KW-frei	kohlenwasserstofffrei
L	Liter
LM	Lösungsmittel

M	molar
max.	maximal
min	Minute
MHz	Megahertz
N	normal
NaOH	Natronlauge
NPOC	non-purchable organic carbon
Nr.	Nummer
n	Anzahl
N	Normal, chem., entsprechend 1 Mol H ⁺ / OH ⁻ L ⁻¹ LM
org.	organisch
O ₂	Sauerstoff
pH	potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenaktivität (H ⁺)
POC	particular organic carbon
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	Respirationsrate
RNA	Ribonukleinsäure
S	Siemens
t	Zeit
T	Temperatur
TG	Trockengewicht
TOC	total organic carbon
UV-C	Ultraviolettstrahlung der Wellenlänge von 100 – 280 nm
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vvm	Gasvolumendurchsatz pro Flüssigkeitsvolumen pro Minute
W	Watt
WW	wet weight
z.B.	zum Beispiel

Präfixe vor Einheiten:

p	Pico (10 ⁻¹²)
n	Nano (10 ⁻⁹)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Übersicht veröffentlichter Filtrationsraten mariner Schwämme. Umgerechnet in Milliliter pro Sekunde und Milliliter Schwammvolumen. Angeordnet nach steigender Filtrationsrate.....	31
Tabelle 3.2: Anteile des marinen Pico-, und Nanoplankton bis 10 µm und ihr berechnetes Kohlenstoffäquivalent..	35
Tabelle 3.3: Zusammenstellung von Respirationsraten verschiedener Schwämme aus der Familie der Demospongia, nach Veröffentlichungszeit geordnet..	44
Tabelle 3.4: Bei Schwammkultivierungsversuchen verwendete Futterpartikel... 50	
Tabelle 4.1: Schwankungsbreite der Wasserparameter in den Aquarienmodulen	62
Tabelle 4.2: Zobell-Flüssigmedium (Zusammensetzung entspricht BD Difco TM marine broth 2216, Nr.: 279110)....	67
Tabelle 4.3: Seawater Medium (= SWES "Seewasser + Erddekokt + Salze")	69
Tabelle 4.4: Spurenelementlösung	70
Tabelle 4.5: Messparameter beim Shimadzu TOC-VCPN	76
Tabelle 5.1: Ergebnisse der NPOC-Messungen von Meerwasserproben aus dem Limski Kanal vom 11.05.2005 aus Tiefen zwischen fünf und 20 Meter.	77
Tabelle 6.1: Berechnete minimale Futterpartikelkonzentration zur Deckung des täglichen Grundumsatzes von 1000 mL Schwammbiovolumen des Schwammes <i>A. aerophoba</i> für $R = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Sauerstoff bei einer Wassertemperatur von 20°C.....	105

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Strukturformeln der marinen Naturstoffe Halichondrin B mit seinem Strukturanalogon E7389 und Discodermolid.....	18
Abbildung 3.2: Hexactinellida Glasschwämme oder Kieselschwämme; (Haeckel, 1904)..	21
Abbildung 3.3: Choanozyte (Bergquist, 1980).	22
Abbildung 3.4: Organisationstypen der Schwämme Ascontyp (a), Sycontyp (b) und Leucontyp (c); A (Atrium), CK (Choanozytenkammern) (Wehner und Gering, 1995).....	23
Abbildung 3.5: Aufnahme einer großen <i>Aplysina</i> -Kolonie im natürlichen Lebensraum vor der kroatischen Küste bei Rovinj.	26
Abbildung 3.6: Ausschnitt aus Pfurtschellers Zoologische Wandtafel Nr. 12 - Darstellungen zum Bau von Schwämmen I. Quelle: Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie, Vergleichende Zoologie	27
Abbildung 3.7: Aeroplysinin-1, aus <i>A. aerophoba</i> isolierte dibromierte Alkaloid-Komponente (Koulman et al., 1996).	28
Abbildung 3.8: Biotransformation von bromierten Alkaloiden in <i>Aplysina</i> -Schwämmen (Teeyapant and Proksch, 1993).	29
Abbildung 3.9: A, Extrazelluläre Exosymbiose; B, Extrazelluläre Endosymbiose; C, Intrazelluläre Symbiose; und D, Intranukleäre Symbiose..	38
Abbildung 3.10: Ein Modulbecken der Aquarienanlage zur <i>ex-situ</i> Kultivierung mariner Schwämme am Lehrstuhl für technische Biologie der Universität Karlsruhe...	47
Abbildung 4.1: Durchflussbecken des Institutes 'Ruđer Bošković' in Rovinj (Kroatien) zur Zwischenlagerung der gesammelten Schwämme.....	53
Abbildung 4.2: Schwammkultivierungsanlage im Labor des Lehrstuhls für technische Biologie, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Universität Karlsruhe (TH)	55
Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau der Versuchsanlage zur Haltung mariner Schwämme	56

Abbildung 4.4: Aufsicht auf die Modulbecken der Aquarienanlage mit Strömungsverlauf vor (links) und nach (rechts) Optimierung der Strömungspumpe.	57
Abbildung 4.5: Beispiel eines Versuchsschwammes <i>A. aerophoba</i> mit einem Schlot auf Kalkstein mit Korallenkleber fixiert.	63
Abbildung 4.6: Versuchsaufbau zur Durchführung der Sauerstoffverbrauchsmessungen in Rovinj, Kroatien.	71
Abbildung 5.1: Respirationsrate (R) in Abhängigkeit der Temperatur (T) für <i>A. aerophoba</i> (n = 4).	78
Abbildung 5.2: Sauerstoffverbrauchsraten (R) von <i>A. aerophoba</i> innerhalb eines Zeitraums von 30 Tagen. Schwarze Punkte (T = 20.0 °C - 22.4 °C), weiße Punkte (T = 18.3 °C to 19.6 °C) (n = 9).	79
Abbildung 5.3: Verlauf des Sauerstoffverbrauch für <i>A. aerophoba</i> # 5 und # 12 in Abhängigkeit der Lichteinstrahlung (Versuch vom 25.04.2007). Die senkrechte Markierung zeigt den Zeitpunkt (15:40 Uhr) der vollen Sonneneinstrahlung auf die Versuchsgefäße.	81
Abbildung 5.4: Messpunkte für die Lichtintensität an unterschiedlichen Punkten eines Aquarienmoduls bei Beleuchtung mit einer Trilux Hallenspiegelleuchte mit HQI-Brenner. Für die unter dieser Leuchte durchgeführten Messungen der Respirationsraten wurde mit einem durchschnittlichen Wert von 100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gerechnet.	82
Abbildung 5.5: Respirationsraten (R) von <i>A. aerophoba</i> in Abhängigkeit der Beleuchtungsintensität (I).	83
Abbildung 5.6: Zusammenhang zwischen Feuchtgewicht (WW), Trockenmasse (DW) und aschefreiem Trockengewicht (AFDW) des Modellorganismus <i>A. aerophoba</i> (prozentual aufgetragen).	86
Abbildung 5.7: Gewichtsabnahme von <i>A. aerophoba</i> (n = 8) ohne Fütterung unter artifiziiellen Bedingungen innerhalb eines Zeitraumes von 40 Tagen. Feuchtgewicht standardisiert auf 100 %. Durchgezogene Linie: Theoretisch erwartete Abnahme. Punkte: experimentelle Ergebnisse, Mittelwert aus 8 Einzelmessungen an verschiedenen Schwämmen.	88

Abbildung 5.8: Linkes Foto: Kolonie von <i>A. aerophoba</i> mit weit geöffneten Oscula im natürlichen Lebensraum. Rechtes Foto: Durch mangelnde Nahrungsversorgung stark degeneriertes Individuum von <i>A. aerophoba</i> mit reduzierter Biomasse, zurückgebildeten Oscula und deutlich zu Tage tretendem Sponginskelett (Pfeile).	89
Abbildung 5.9: Partikelgrößenverteilung des marinen, kokkoiden Cyanobakteriums <i>Synechococcus</i> sp. WH 8102. Mittlerer Durchmesser 1,05 μm , Peakdurchmesser 0,95 μm	90
Abbildung 5.10: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums <i>Janibacter limosus</i> (Hel01), ein kokkoides, unbewegliches, aerobes, gram-positives Bakterium. Mittlerer Durchmesser 1,23 μm , Peakdurchmesser 1,07 μm	91
Abbildung 5.11: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums <i>Halomonas variabilis</i> Hel04, ein bewegliches, stäbchenförmiges, gram-positives Bakterium. Mittlerer Durchmesser 1,20 μm , Peakdurchmesser 1,04 μm	91
Abbildung 5.12: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums SB89. Mittlerer Durchmesser 1,01 μm , Peakdurchmesser 0,93 μm	92
Abbildung 5.13: Partikelgrößenverteilung des marinen Bakteriums SB177. Mittlerer Durchmesser 1,21 μm , Peakdurchmesser 1,00 μm	92
Abbildung 5.14: Partikelgrößenverteilung des verwendeten Futterpartikelgemisches aus <i>Janibacter limosus</i> Hel01, <i>Halomonas variabilis</i> Hel04, SB89 und SB177 sowie <i>Synechococcus</i> sp. WH 8102. Mittlerer Durchmesser 1,13 μm , Peakdurchmesser 1,00 μm	93
Abbildung 5.15: Partikelgrößenverteilung der marinen Mikroalge <i>P. tricornutum</i> . Mittlerer Durchmesser 4,36 μm , Peakdurchmesser 4,05 μm	94
Abbildung 5.16: Partikelfiltrationsraten (F) für <i>A. aerophoba</i> bei verschiedenen <i>Synechococcus</i> sp. Konzentrationen (C).....	95
Abbildung 5.17: Partikelfiltrationsraten (F) für <i>A. aerophoba</i> bei verschiedenen <i>P. tricornutum</i> Konzentrationen.	96
Abbildung 5.18: Kohlenstoffaufnahmeraten ($F \cdot C_p$) von <i>A. aerophoba</i> in Abhängigkeit der Partikelkonzentrationen (C) von <i>Synechococcus</i> sp. (Weiße Punkte) und <i>P. tricornutum</i> (Schwarze Punkte). Mindestkohlenstoffmenge zur Deckung des Grundstoffwechsels als gestrichelte Linie dargestellt.....	98

- Abbildung 6.1: Eines der Modulbecken der Schwammzuchtanlage mit 100 Liter Inhalt. Besetzt mit etwa 20 frisch gesammelten Kolonien der Art *A. aerophoba*. Geschätztes Gesamtbiovolumen der Schwämme von 1000 mL 104
- Abbildung 6.2: Simulierter Verlauf einer quasi-kontinuierlichen Fütterung (durchgezogene Linie) und einer einmaligen Zudosierung (gepunktete Linie) der Futterpartikelmenge über einen Zeitraum von zwölf Stunden, Darstellung halblogarithmisch. 106

10 Literaturverzeichnis

- Abbt-Braun, G. (2002). Huminstoffe - Vorkommen, Charakterisierung und Reaktionen. *Wasser- und Geotechnologie* 4, 41-49.
- Andrade, P., Willoughby, R., Pomponi, S.A. and Kerr, R.G. (1999). Biosynthetic studies of the alkaloid, stevensine, in a cell culture of the marine sponge *Teichaxinella morchella*. *Tetrahedron Letters* 40, 4775-4778.
- Arillo, A., Bavestrello, G., Burlando, B. and Sarà, M. (1993). Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges - a possible mechanism. *Mar Biol* 117, 159-162.
- Arndt, W. (1928). Haltung und Aufzucht von Meeresschwämmen. In: *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, vol. Abt.IX; Teil 5, ed. E. Aberhalden, 443-464.
- Ayling, A. (1983). Growth and regeneration rates in thinly encrusting demospongiae from temperate waters. *Biol. Bull.* 165, 343-352.
- Barthel, D. and Theede, H. (1986). A new method for the culture of marine sponges and its application for experimental studies. *Ophelia* 25, 75-82.
- Barthel, D. (1988). On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight.2. Biomass, production, energy budget and integration in environmental processes. *Mar Ecol-Prog Ser* 43, 87-93.
- Bayer, K., Schmitt, S. and Hentschel, U. (2008). Physiology, phylogeny and *in-situ* evidence for bacterial and archaeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Environ Microbiol*: Epub ahead of print
- Belarbi, E.H., Gomez, A.C., Chisti, Y., Camacho, F.G. and Grima, E.M. (2003). Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances* 21, 585-598.
- Bell, A.H., Bergquist, P.R. and Battershill, C.N., (1999). Feeding biology of *Polymastia croceus*. In: Hooper, J.N.A. (Ed.), *Proceedings 5th International Sponge Symposium*. Mem. Qld. Mus., 44, 51/56.
- Bergmann, W. and Feeney, R.J. (1951). Contributions to the study of marine products.32. The Nucleosides of Sponges.1. *Journal of Organic Chemistry* 16, 981-987.
- Bergquist, P.R. (1978). *Sponges*. University of California Press: Berkeley & Los Angeles.
- Bergquist, P.R. (1980). A Revision of the supraspecific classification of the orders *Dictyoceratida*, *Dendroceratida* and *Verongida* (Class Demospongiae). *New Zealand Journal of Zoology* 7, 443-503.

- Bewley, C.A., Holland, N.D. and Faulkner, D.J., (1996): Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52(7), 716 – 722.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. (2008). Marine natural products. *Nat Prod Rep* 25, 35-94.
- Bowerbank, J.S. (1858). On the Anatomy and Physiology of the Spongiadae. Part I. On the Spicula. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 148(2), 279-332, pls XXII-XXVI.
- Bultel-Ponce, V., Berge, J.P., Debitus, C., Nicolas, J.L. and Guyot, M. (1999). Metabolites from the sponge-associated bacterium *Pseudomonas* species. *Mar Biotechnol* 1, 384-390.
- Campbell, L., Nolla, H.A. and Vaultot, D. (1994). The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific-Ocean. *Limnol Oceanogr* 39, 954-961.
- Carlson, C.A. (2002). Chapter 4 - Production and removal processes. In: *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, ed. D.A.C. Hansell, C. A.: Academic Press.
- Cheshire, A.C. and Wilkinson, C.R. (1991). Modeling the photosynthetic production by sponges on Davies-Reef, Great-Barrier-Reef. *Mar Biol* 109, 13-18.
- Cheshire, A.C., Wilkinson, C.R., Seddon, S. and Westphalen, G. (1997). Bathymetric and seasonal changes in photosynthesis and respiration of the phototrophic sponge *Phyllospongia lamellosa* in comparison with respiration by the heterotrophic sponge *Ianthella basta* on Davies Reef, Great Barrier Reef. *Mar Freshwater Res* 48, 589-599.
- Coma, R., Ribes, M., Gili, J.M. and Zabala, M. (2002). Seasonality of *in situ* respiration rate in three temperate benthic suspension feeders. *Limnol Oceanogr* 47, 324-331.
- Cotter, A.J.R. (1978). Re-investigation of size, axial gradients and light as factors affecting the respiration of certain marine sponges. *Comp. Biochem. Physiol.* 60A, 117–122.
- Danovaro, R., Anno, A.D., Pusceddu, A., Marrale, D., Croce, N.D., Fabiano, M. and Tselepidis, A. (2000). Biochemical composition of pico-, nano- and micro-particulate organic matter and bacterioplankton biomass in the oligotrophic Cretan Sea (NE Mediterranean). *Progress in Oceanography* 46, 279-310.
- de Caralt, S., Gemma, A. and Uriz, M.-J. (2003). Long-term culture of sponge explants: conditions enhancing survival and growth, and assessment of bio-activity. *Biomol Eng* 20, 339-347.

- de Caralt, S.N., Ojens, H., Uriz, M.J. and Wijffels, R.H. (2007). Cultivation of sponge larvae: Settlement, survival and growth of juveniles. *Mar Biotechnol* 9, 592-605.
- de Laubenfels, M.W. (1932). Physiology and morphology of Porifera exemplified by *Iotrochota birotulata* Higgin. Tort Lab Paper. Carnegie Inst Wash 28, 37-66.
- de Souza, M.V.N. (2004). New natural products able to act on the stabilization of microtubules, an important target against cancer. *Quimica Nova* 27, 308-312.
- Diaz, M.C. and Ward, B.B. (1997). Sponge-mediated nitrification in tropical benthic communities. *Mar Ecol-Prog Ser* 156, 97-107.
- Ducklow, H.W., Kirchman, D.L., Quinby, H.L., Carlson, C.A. and Dam, H.G. (1993). Stocks and dynamics of bacterioplankton carbon during the spring bloom in the Eastern North-Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res Pt II* 40, 245-263.
- Duckworth, A. and Battershill, C. (2003). Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. *Aquaculture* 221, 311-329.
- Duckworth, A.R., Samples, G.A., Wright, A.E. and Pomponi, S.A. (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.
- Duckworth, A.R., Battershill, C.N. and Schiel, D.R. (2004). Effects of depth and water flow on growth, survival and bioactivity of two temperate sponges cultured in different seasons. *Aquaculture* 242, 237-250.
- Duckworth, A.R. and Pomponi, S.A. (2005). Relative importance of bacteria, microalgae and yeast for growth of the sponge *Halichondria melanadocia* (DeLaubenfels, 1936): A laboratory study. *J Exp Mar Bio Ecol* 323, 151-159.
- Duckworth, A.R., Bruck, W.M., Janda, K.E., Pitts, T.P. and McCarthy, P.J. (2006). Retention efficiencies of the coral reef sponges *Aplysina lacunosa*, *Callyspongia vaginalis* and *Niphates digitalis* determined by Coulter counter and plate culture analysis. *Mar Biol Res* 2, 243-248.
- Dumdei, E.J., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Battershill, C.N. and Page, M.J., (1998). The whys and whats of sponge chemistry: why chemists extract sponges and what problems does this cause? In: Watanabe, Y., Fusetani, N. (Eds.), *Sponge Sciences. Multidisciplinary Perspectives*. Springer, Tokyo, pp. 353-364.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H.J. and Proksch, P. (1997). Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J Chem Ecol* 23, 1451-1462.

- Ebel, R., Marin, A. and Proksch, P. (1999). Organ-specific distribution of dietary alkaloids in the marine opisthobranch *Tylodina perversa*. *Biochem Syst Ecol* 27, 769-777.
- Edrada, R.A.P., P.; Wray, V.; Christ, R.; Witte, L.; and Van Soest, R. W. M. (1996). Bioactive isoquinoline quinone from an undescribed philippine marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Journal of Natural Products* 59, 973-976.
- Engel, S. and Pawlik, J.R. (2005). Interactions among Florida sponges. I. Reef habitats. *Marine Ecology Progress Series* Vol. 303, 133–144, 2005.
- Elvin, D.W. (1976). Seasonal growth and reproduction of an intertidal sponge *Haliclona permollis* (Bowerbank). *Biol Bull* 151, 108-125.
- Fattorusso, E., Sodano, G. and Minale, L. (1972). Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from sponge *Verongia aerophoba*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* 1, 16.
- Faulkner, J.H., M. K.; Salomon, C. E.; and Schmidt, E. W. (1999). Localisation of bioactive metabolites in marine sponges. *Memoirs of the Queensland Museum* 44, 167-173.
- Faulkner, D.J. (2001). Marine Natural Products. *Nat Prod Rep* 18, 1-49.
- Faulkner, D.J. (2002). Marine natural products. *Nat Prod Rep* 19, 1-48.
- Faulkner, D.J., Harper, M.K., Haygood, M.G., Salomon, C.E. and Schmidt, E.W. (2000). Symbiotic bacteria in sponges: Sources of bioactive substances. In: *Drugs from the sea*, ed. N. Fusetani, Basel: Karger, 107-119.
- Feher, M. and Schmidt, J.M. (2003). Property distributions: Differences between drugs, natural products and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43, 218-227.
- Fell, P.E. and Lewandrowski, K.B. (1981). Population dynamics of the estuarine sponge, *Halichondria* sp. within a New England eelgrass community. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 55, 49-63.
- Fernandez, F.G.A., Hall, D.O., Guerrero, E.C., Rao, K.K. and Grima, E.M. (2003). Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology* 103, 137-152.
- Flowers, A.E., Garson, M.J., Webb, R.I., Dumdei, E.J. and Charan, R.D. (1998). Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell Tissue Res* 292, 597-607.
- Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. and 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, H. and Hentschel, U. (2001). Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol Ecol* 38, 105-113.
- Frost, T.M. and Williamson, C.E. (1980). *In situ* determination of the effect of symbiotic algae on the growth of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Ecology* 61, 1361-1370.
- Fry, W.G. (1971). The biology of larvae of *Ophlitaspongia seriata* from two North Wales populations. In: Proceedings Fourth European Marine Biology Symposium, Crisp, D.J. (ed.). Cambridge, U.K.: Cambridge University Press; 155-178.
- Gerodette, T. and Flechsig, A.O., (1979). Sediment-induced reduction in the pumping rate of the tropical sponge *Verongia lacunose*. *Mar. Biol.* 55, 103 – 110.
- Gómez, R., Erpenbeck, D., van Dijk, T., Richelle-Maurer, E., Devijver, C., Braekman, J.C., Woldringh, C. and van Soest, R.W.M. (2002). Identity of cyanobacterial symbiont of *Xestospongia muta*. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova* 66, 6782-83.
- Gunasekera, S.P., Gunasekera, M., Longley, R.E. and Schulte, G.K. (1990). Discodermolide - a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Journal of Organic Chemistry* 55, 4912-4915.
- Hart J. B., Lill R. E., Hickford S. J. H., Blunt J. W. and G., M.M.H. (2000). The Halichondrins: Chemistry, biology, supply and delivery. In: *Drugs from the sea*, ed. N. Fusetani, Basel: Krager, 134-153.
- Hausmann, R., Vitello, M., Leitermann, F. and Syldatk, C. (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., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C. and Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 35, 305-312.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J. and Moore, B.S. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4431-4440.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J. and Horn, M. (2003). Microbial diversity of marine sponges. In: *Marine molecular biotechnology- Sponges (Porifera)*, ed. W.E.G. Müller, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 59-88.
- Hentschel, U., Usher, K.M. and Taylor, M.W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* 55, 167-177.

- Hinde, R., Pironet, F. and Borowitzka, M. A. (1994). Isolation of *Oscillatoria spongelliae*, the filamentous cyanobacterial symbiont of the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Mar. Biol.* 119, 99–104.
- Hooper, N.A. and VanSoest, R.W.M. (2003 (2004)). *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. The end of a beginning.* *Boll. Mus Ist. Biol. Univ. Genova* 68, 19-38.
- Johnston, I.S. and Hildemann, W.H. (1982). Cellular organization in the marine Demosponge *Callyspongia diffusa*. *Mar Biol* 67, 1-7.
- Jorgensen, C.B. (1966). *Biology of suspension feeding.* Pergamon Press: Oxford.
- Karchenko, T.A. and Lyashenko, A.V. (1986). Oxygen consumption of freshwater sponges. *Hydrobiol. J.* 22, 99–102.
- Kilian, E.F. (1952). Wasserströmung und Nahrungsaufnahme beim Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis*. *Z Vergl Physiol* 34, 407-447.
- Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A.C., vanUden, W., Konings, A.W.T., Pedersen, J.A., Pras, N. and Woerdenbag, H.J. (1996). Cytotoxicity and mode of action of Aeroplysinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products* 59, 591-594.
- Kowalke, J. (2000). Ecology and energetics of two Antarctic sponges. *J Exp Mar Bio Ecol* 247, 85-97.
- Kreuter, M.H., Bernd, A., Holzmann, H., Mullerklieser, W., Maidhof, A., Weissmann, N., Kljajic, Z., Batel, R., Schroder, H.C. and Müller, W.E.G. (1989). Cytostatic activity of Aeroplysinin-1 against lymphoma and epithelioma cells. *Z Naturforsch* 44, 680-688.
- Kreuter, M.H., Leake, R.E., Rinaldi, F., Mullerklieser, W., Maidhof, A., Müller, W.E.G. and Schröder, H.C. (1990). Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of Egf-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-Aeroplysinin-1. *Comp Biochem Phys B* 97, 151-158.
- Kreuter, M.H.R., A.; Chang, S.; Steffen, R.; Michaelis, M.; Kljajic, Z.; Bachmann, M.; Schröder, H.C.; and Müller, W.E.G. (1992). Production of the cytostatic agent aeroplysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in in vitro culture. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology & Endocrinology* 101, 183-187.
- Langenbruch, P.F. (1983). Untersuchungen zum Körperbau von Meereschwämmen. II. Das Wasserleitungssystem von *Halichondria panicea*. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 36, 337-346.

- Larkum, A.W.D., Cox, G.C., Hiller, R.G., Parry, D.L. and Dibbayawan, T.P. (1987). Filamentous cyanophytes containing phycourobilin and in symbiosis with sponges and an ascidian of coral reefs. *Mar. Biol.* 95, 1–13.
- Levi, C. and Preiss, J. (1976). Regulatory properties of ADP-glucose pyrophosphorylase of blue-green bacterium *Synechococcus*-6301. *Plant Physiology* 58, 753-756.
- Li, C.-W., Chen, J.-Y. and Hua, T.-E. (1998). Precambrian sponges with cellular structures. *Science*, 279, 879-882.
- Loiseleur, O., Koch, G., Cercus, J. and Schurch, F. (2005). A formal synthesis of (+)-discodermolide. *Organic Process Research & Development* 9, 259-271.
- Lynch, T.C.; and Philips, E. J. (2000). Filtration of the bloom-forming cyanobacteria *Synechococcus* by three sponge species from Florida Bay, USA. *Bulletin of Marine Science* 67, 923-936.
- Maldonado, M. and 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.
- Martello, L.A., McDaid, H.M., Regl, D.L., Yang, C.P.H., Meng, D.F., Pettus, T.R.R., Kaufman, M.D., Arimoto, H., Danishefsky, S.J., Smith, A.B. and Horwitz, S.B. (2000). Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research* 6, 1978-1987.
- Mayer, A.M.S. and Hamann, M.T. (2004). Marine pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis and antiviral activities; Affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol* 6, 37-52.
- Meiser, A., Schmid-Staiger, U. and Trosch, W. (2004). Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *Journal of Applied Phycology* 16, 215-225.
- Mendola, D. (2003). Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomol Eng* 20, 441-458.
- Mickel, S.J. (2007). Total synthesis of the marine natural product (+)-discodermolide in multigram quantities. *Pure and Applied Chemistry* 79, 685-700.
- Milanese, M., Chelossi, E., Manconi, R., Sarà, A., Sidri, M. and Pronzato, R. (2003). The marine sponge *Chondrilla nucula* (Schmidt, 1862) as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. *Biomol Eng* 20, 363-368.

- Mita, A., Lockhart, A.C., Chen, T.L., Bochinski, K., Curtright, J., Cooper, W., Hammond, L., Rothenberg, M., Rowinsky, E. and Sharma, S. (2004). A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 22, 133S-133S.
- Morel, A., Ahn, Y.-H., Partensky, F., Vaultot, D. and Claustre, H.(1993). *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: a comparative study of their optical properties in relation to their size and pigmentation, *J Mar Res* 51, 617-649.
- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N. and Duckworth, A.R. (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* 70, 15-25.
- Müller, W.E.G. (1995). Molecular Phylogeny of Metazoa (Animals) - Monophyletic Origin. *Naturwissenschaften* 82, 321-329.
- U.S. National Institutes of Health (NIH) Datenbank des US-Gesundheitsministeriums für klinische Studien. <http://clinicaltrials.gov>.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70, 461-477.
- Nickel, M. (2001). Cell biology and biotechnology of marine invertebrates. Sponges (Porifera) as model organisms. *Arbeiten und Mitteilungen aus dem Biologischen Institut der Universität Stuttgart* 32.
- Nickel, M. (2004). Kinetics and rhythm of body contractions in the sponge *Tethya wilhelma* (Porifera: Demospongiae). *Journal of Experimental Biology* 207, 4515-4524.
- Osinga, R., Planas Muela, E., Tramper, J. and R.H., W. (1998). *In vitro* cultivation of four marine sponge species. Determination of the nutritional demands. In: *Marine microorganisms for industry*, ed. Y.M.F. Le Gal, A.: Ifremer, 121-127.
- Osinga, R., de Beukelaer, P.B., Meijer, E.M., Tramper, J. and Wijffels, R.H. (1999). Growth of the sponge *Pseudosuberites* (aff.) *andrewsi* in a closed system. *Journal of Biotechnology* 70, 155-161.
- Osinga, R., Kleijn, R., Groenendijk, E., Niesink, P.; Tramper, J.; and Wijffels, R.H. (2001). Development of In Vivo Sponge Cultures: Particle Feeding by the Tropical Sponge *Pseudosuberites* aff. *Andrewsi*.
- Osinga, R., Belaribi, E.H., Grima, E.M., Tramper, J. and Wijffels, R.H. (2003). Progress towards a controlled culture of the marine sponge *Pseudosuberites andrewsi* in a bioreactor. *Journal of Biotechnology* 100, 141-146.

- Partensky, F., Hess, W.R. and Vaultot, D. (1999). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 106-127.
- Paterson, I. and Gardner, N.M. (2007). Design, synthesis and biological evaluation of a macrocyclic discodermolide/dictyostatin hybrid. *Chemical Communications*, 49-51.
- Patil, V., Kallqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. and Gislerod, H.R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International* 15, 1-9.
- Pile, A.J., Patterson, M.R. and Witman, J.D. (1996). *In situ* grazing on plankton <10 µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Mar Ecol-Prog Ser* 141, 95-102.
- Pile, A.J. (1997). Finding Reiswig's missing carbon: Quantification of sponge feeding using dual-beam flow cytometry. 8th Int. Coral Reef Symposium, 2, 1403-1410.
- Pile, A.J. and Young, C.M. (2006). The natural diet of a hexactinellid sponge: Benthic-pelagic coupling in a deep-sea microbial food web. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* 53, 1148-1156.
- Poirrier, M.A., Friedrich, A.B. and LaBiche, R.A. (1981). A continuous-flow system for growing freshwater sponges in the laboratory. *Hydrobiologia* 79, 255-259.
- Pomponi, S.A. (1999). The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology* 70, 5-13.
- Price, I.R., Fricker, R.L. and Wilkinson, C.R. (1984). *Ceratodictyon spongiosum* (Rhodophyta), the macroalgal partner in an alga-sponge symbiosis, Grown in unialgal culture. *Journal of Phycology* 20, 156-158.
- Proksch, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon* 32, 639-655.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Schupp, W.H., Lin, S., Wray, V. and Steube, K. (2003). Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 75, Nos. 2-3, pp. 343-352.
- Pronzato, R. (1999). Sponge-fishing, disease and farming in the Mediterranean Sea. *Aquat Conserv* 9, 485-493.
- Pronzato, R., Bavestrello, G., Cerrano, C., Magnino, G., Manconi, R., Pantelis, J., Sarà, A. and Sidri, M. (1999). Sponge farming in the Mediterranean Sea: New Perspectives. *Mem. Queensland Museum* 44, 485-491.

- Reiche, D. (2003). Roche Lexikon Medizin, 5.Auflage; Urban & Fischer Verlag, München.
- Reiswig, H.M. (1971a). *In situ* pumping activities of tropical demospongiae. *Mar Biol* 9, 38-50.
- Reiswig, H.M. (1971b). Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol Bull* 141, 568-591.
- Reiswig, H.M. (1974a). Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Canadian Journal of Zoology* 53, 582-589.
- Reiswig, H.M. (1974b). Water transport, respiration and energetics of 3 tropical marine sponges. *J Exp Mar Bio Ecol* 14, 231-249.
- Reiswig, H.M. (1975). The aquiferous systems of three marine demospongiae. *J. Morph.* 145, 493-502
- Reiswig, H.M. (1981). Particulate organic-carbon of bottom boundary and submarine cavern waters of tropical coral reefs. *Mar Ecol-Prog Ser* 5, 129-133.
- Reitner, J. and Wörheide, G. (2002). Non-lithistid fossil Demospongiae –Origins of their palaeobiodiversity and highlights in history of preservation. In J. N. A. Hooper and R. W. M. van Soest (eds.), *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*, pp. 52–70. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Ribes, M., Coma, R. and Gili, J.-M. (1999a). Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Marine Ecological Progress Series* 176, 179-190.
- Ribes, M., Coma, R. and 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.
- Riisgard, H.U., Thomassen, S., Jakobsen, H., Weeks, J.M. and Larsen, P.S. (1993). Suspension-Feeding in Marine Sponges *Halichondria panicea* and *Haliclona urceolus* - Effects of Temperature on Filtration-Rate and Energy-Cost of Pumping. *Mar Ecol-Prog Ser* 96, 177-188.
- Rützler, K. (1985). Association between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. 3d Int. Sponge Conf.
- Ryther, J.H. and Goldman, J.C. (1975). Microbes as food in mariculture. *Annu Rev Microbiol* 29, 429-443.
- Sarà, M. (1971). Ultrastructural aspects of symbiosis between 2 species of genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae). *Mar Biol* 11, 214-221.

- Sarà, M., Bavestrello, G., Cattaneo-Vietti, R. and Cerrano, C. (1998). Endosymbiosis in sponges: Relevance for epigenesis and evolution. *Symbiosis* 25, 57–70.
- Savarese, M., Patterson, M. R.. (1997). Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 1. *In situ* pumping rates. *Limnol. Oceanogr.* 42, 171-178.
- Schmidt, O. (1862). Die Spongien des adriatischen Meeres. Wilhelm Engelmann Verlag: Leipzig.
- Schmidt, E.W., Obraztsova, A.Y., Davidson, S.K., Faulkner, D.J. and Haygood, M.G. (2000). Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, "*Candidatus Entotheonella palauensis*". *Mar Biol* 136, 969-977.
- Schmitz, F.J. (1994). Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. Sponges in time and space, Proceedings of the 4th international porifera congress, Amsterdam, Netherlands, 19-23 April 1993.
- Sebens, K.P. (1987). The ecology of indeterminate growth in animals. *Annual Review in Ecology and Systematics* 18, 371-407.
- Sidri, M., Brümmer, F., Milanese, M., Nickel, M. and Zucht, W. (2004). Morphological plasticity, locomotion and epibiosis in the Mediterranean sponge *Chondrilla nucula* (Schmidt, 1862) (Porifera, Demospongiae): an overview.
- Simpson, T.L. (1968). The biology of the marine sponge *Microciona prolifera* (Ellis and Solander), II: temperature-related, annual changes in functional and reproductive elements with a description of larval metamorphosis. *J Exp Mar Biol Ecol* 2, 252–277.
- Strathmann, R.R. (1967). Estimating organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol Oceanogr* 12, 411-418.
- Teeyapant, R. and Proksch, P. (1993). Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba* - evidence for an induced chemical defense? *Naturwissenschaften* 80, 369-370.
- Teeyapant, R., Woerdenbag, H.J., Kreis, P., Hacker, J., Wray, V., Witte, L. and Proksch, P. (1993). Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal Of Biosciences* 48, 939-945.
- Thacker, R.W., Becerro, M.A., Lumbang, W.A. and Paul, V.J. (1998). Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology* 79, 1740-1750.

- Thacker, R. W. and Starnes, S. (2003). Host specificity of symbiotic cyanobacteria, *Oscillatoria spongelliae*, in marine sponges, *Dysidea* spp. *Mar. Biol.* *142*, 643–648.
- Thacker, R.W. (2005). Impacts of shading on sponge-cyanobacteria symbioses: A comparison between host-specific and generalist associations. *Integrative and Comparative Biology* *45*, 369-376.
- Thakur, N.L., Hentschel, U., Krasko, A., Pabel, C.T., Anila, A.C., and Müller, W.E.G. (2003). Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for chemical defense. *Aquatic Microb Ecol* *31*. 77–83.
- Thomassen, S. and Riisgard, H.U. (1995). Growth and energetics of the sponge *Halichondria panicea*. *Mar Ecol-Prog Ser* *128*, 239-246.
- Thompson, J.E., Barrow, K.D. and Faulkner, J.D. (1983). Localization of two brominated metabolites, arothionin and homoarothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zool (Stockh)* *44*, 199–210
- Towle, M.J., Salvato, K.A., Budrow, J., Wels, B.F., Kuznetsov, G., Aalfs, K.K., Welsh, S., Zheng, W.J., Seletsky, B.M., Palme, M.H., Habgood, G.J., Singer, L.A., DiPietro, L.V., Wang, Y., Chen, J.J., Quincy, D.A., Davis, A., Yoshimatsu, K., Kishi, Y., Yu, M.J. and Littlefield, B.A. (2001). *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of Halichondrin B. *Cancer Research* *61*, 1013-1021.
- Turon, X., Tarjuelo, I. and 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. *Functional Ecology* *12*, 631-639.
- Turon, X., Becerro, M.A. and Uriz, M.J. (2000), Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Res* *301*, 311–322
- Unson M.D. and Faulkner D.J. (1993) Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia*, *49*, 349-353.
- Unson, M.D., Holland, N.D. and Faulkner, D.J. (1994). A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar Biol Res* *119*, 1-11.
- Usher, K.M., Kuo, J., Fromont, J. and Sutton, D.C. (2001). Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* *461*, 15-23.

- Vacelet, J. (1971). Electron-Microscopic study on association between blue-green-algae (*Chroococcales*) and sponge of genus *Verongia*. *J Microsc* 12, 363-380.
- Vacelet, J. and Donadey, C. (1977). Electron-Microscope study of association between some sponges and bacteria. *J Exp Mar Bio Ecol* 30, 301-314.
- Van Soest, R.W.M. (1996). Porifera. In: *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*, eds. W. Westheide and R. Rieger, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 98-119.
- Van Soest, R. W. M. and Hooper, J. N. A. (2002). *Systema Porifera - A Guide to the Classification of Sponges (Vol. 1)*. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Verity, P.G., Robertson, C.Y., Tronzo, C.R., Andrews, M.G., Nelson, J.R. and Sieracki, M.E. (1992). Relationships between Cell-Volume and the Carbon and Nitrogen-Content of Marine Photosynthetic Nanoplankton. *Limnol Oceanogr* 37, 1434-1446.
- Vogel, S. (1974). Current-induced flow through the sponge *Halichondria*. *Biol. Bull.* 147, 443-456.
- Vogel, S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 2069-2071.
- Warburton, F.E. (1958). Reproduction of fused larvae in the boring sponge, *Cliona celata* Grant. *Nature* 181, 493-494.
- Waterbury, J.B., Watson, S.W., Guillard, R.R.L. and Brand, L.E. (1979). Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* 277, 293-294.
- Wehner R. und Gering W. (1995). *Zoologie* Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 23. neu bearbeitete Auflage.
- Wehrl, M., Steinert, M. and Hentschel, U. (2007). Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb Ecol* 53, 355-365.
- Weiss, R.F. (1970). Solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Res* 17, 721-735.
- Wilkinson, C.R. (1978 a). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* 49, 161-167.
- Wilkinson, C.R. (1978 b). Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar Biol* 49, 177-185.

- Wilkinson, C.R. and Fay, P. (1979). Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* 279, 527-529.
- Wilkinson, C.R. and Vacelet, J. (1979). Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. *J Exp Mar Bio Ecol* 37, 91-104.
- Wilkinson, C.R.N., M.; Austin, B.; and Colwell, R. R. (1981). Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microb Ecol* 7, 13-21.
- Wilkinson, C.R. (1983). Net primary productivity in coral reef sponges. *Science* 219, 410-412.
- Wilkinson, C.R., Garrone, R. and Vacelet, J. (1984). Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 220, 519-528.
- Wilkinson, C.R. (1987). Interocean Differences in Size and Nutrition of Coral-Reef Sponge Populations. *Science* 236, 1654-1657.
- Wilkinson, C.R. (1992). Symbiotic interactions between marine sponges and algae. In: *Algae and symbioses: Plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*, ed. W. Reisser, Bristol, England: Biopress Limited, 111-151.
- Witte, U. and Graf, G. (1996). Metabolism of deep-sea sponges in the Greenland-Norwegian Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 198, 223-235.
- Yahel, G., Sharp, J.H., Marie, D., Häse, D.; and Genin, A. (2003). *In situ* feeding and element removal in the symbiont-bearing sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC is the major source for carbon. *Limnol Oceanogr* 48, 141-149.
- Zheng, W.J., Seletsky, B.M., Palme, M.H., Lydon, P.J., Singer, L.A., Chase, C.E., Lemelin, C.A., Shen, Y.C., Davis, H., Tremblay, L., Towle, M.J., Salvato, K.A., Wels, B.F., Aalfs, K.K., Kishi, Y., Littlefield, B.A. and Yu, M.J. (2004). Macrocyclic ketone analogues of Halichondrin B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 5551-5554.

Marine Schwämme sind als Quelle zahlreicher neuer Naturstoffe in den Fokus der pharmakologischen Wirkstoffforschung gerückt. Das sogenannte Nachschubproblem verhindert weitergehende Untersuchungen dieser vielversprechenden Naturstoffe. Ein Lösungsansatz bietet die biotechnologische Kultivierung von Schwamm biomasse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, grundlegende Untersuchungen am Modellorganismus *Aplysina aerophoba* durchzuführen, die Aussagen über die quantitativen Anforderungen von Schwämmen unter *ex-situ* Bedingungen ermöglichen sollte. Über die Bestimmung von Respirations- und Filtrationsraten sollte die Machbarkeit der biotechnologischen Kultivierung unter Laborbedingungen beurteilt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass *A. aerophoba* unter artifizialen Bedingungen in der Lage ist, seine Massenbilanz über partikuläre organische Substanzen zu decken. Zusätzlich spielt die Beleuchtungsintensität eine wichtige Rolle.