

**Universität Bremen
Fachbereich 2 Biologie**

Untersuchungen zur fraßhemmenden Aktivität von Schwamminhaltsstoffen gegenüber Fischen

Diplomarbeit

vorgelegt von

**Carsten Thoms
aus
Karlsruhe**

Bremen 2000

Diplomarbeit

**Untersuchungen zur fraßhemmenden
Aktivität von Schwamminhaltsstoffen
gegenüber Fischen**

vorgelegt von Carsten Thoms im Dezember 2000

**Betreuer: Prof. Dr. Matthias Wolff
Zweit-Gutachter: Prof. Dr. Peter Proksch**

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Wolff dafür, daß er mir diese Arbeit ermöglicht und mich mit konstruktiver Kritik und wertvollen Ratschlägen unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Peter Proksch bedanken. Durch die Vergabe eines sehr interessanten, ökologisch orientierten Themas gab er mir die Möglichkeit, erste Schritte in der Welt der marinen Naturstoffforschung zu machen. Sein stetes Interesse am Verlauf und den Ergebnissen meiner Diplomarbeit und die freundliche Unterstützung, die er mir auch bei ausgefalleneren Ideen - wie dem Aufbau des Versuchsaquariums in Düsseldorf - gewährte, haben mir bei meinen Arbeiten sehr geholfen.

Dr. Andreas Kunzmann vom Zentrum für Marine Tropenökologie in Bremen vermittelte vor Beginn dieser Arbeit den Kontakt zwischen mir und Herrn Prof. Dr. Proksch. Dafür, und für eine Reihe guter Ratschläge, möchte ich ihm danken.

Für die Unterstützung bei meinen Experimenten am und im Mittelmeer, sowie für die Bereitstellung von Tauchausrüstung und Laborgeräten bedanke ich mich bei den Betreibern und Assistenten des Instituts für Meereswissenschaften HYDRA auf Elba.

Für die Messung der Gewebestickstoffgehalte der Schwämme danke ich Herrn Prof. Dr. Werner Kaiser vom Botanischen Institut der Universität Würzburg.

Bei Herrn Dr. Rob van Soest vom Zoologischen Museum der Universität Amsterdam bedanke ich mich für die taxonomische Einordnung der Schwämme.

Ganz besonders danke ich allen meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Jan Hiort hat mich in die verschiedenen Laborarbeiten eingewiesen, gemeinsam mit mir nach Schwämmen getaucht und mir Schwammextrakte für die Vorversuche zur Verfügung gestellt. Dafür möchte ich ihm danken.

Vielen Dank auch an Gero Eck, der mich als Navigator bei vielen meiner Tauchgänge begleitet und mich auch bei meinen Experimenten auf Elba unterstützt hat.

Bei Wafaa Hassan möchte ich mich für die Unterstützung bei den Fütterungsexperimenten bedanken.

Dr. Rainer Ebel danke ich für die anregenden und angeregten Diskussionen über die Inhaltsstoffe der Aplysiniidae und deren ökologische Funktion.

Meine Eltern unterstützten mich nicht nur finanziell, sondern auch dadurch, daß sie mir alle Freiheiten bei der Wahl und dem Wechsel meines Studienfaches ließen und mir dabei stets das Gefühl gaben, das Richtige zu tun. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Zuletzt, aber am allerherzlichsten danke ich meiner Verlobten Nadine Schlosser. Sie war mit mir im Mittelmeer auf Fischfang, hat die Fische versorgt und gefüttert, meine Ideen zur Ökologie der Schwamminhaltsstoffe mit mir diskutiert, diese Arbeit Korrektur gelesen und dafür gesorgt, daß auch Tage, die ich fast vollständig mit dem Schreiben am Computer zubringen mußte, zu schönen Tagen wurden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Schwämme in ihrem Lebensraum	1
1.2. Der chemische Faulschutz der Schwämme	3
1.3. Biologische Waffen im Einsatz gegen Raumkonkurrenten	4
1.4. Der Schutz der Schwämme vor Fraßfeinden	5
1.5. Die verletzungsinduzierte Abwehrreaktion der Schwammfamilie Aplysinidae	8
1.6. Der Ursprung der Schutzsubstanzen	12
1.7. Medikamente aus dem Meer	12
1.8. Die Ziele meiner Arbeit	14

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Chemikalien	16
2.1.1. Material für die Probenahme auf Elba	16
2.1.2. Material für die Haltung der Fische und die Fütterungsversuche	16
2.1.3. Chemikalien und Geräte für die Extraktion und Fraktionierung	17
2.1.3.1. Chemikalien	17
2.1.3.2. Laborgeräte	17
2.1.3.3. Chromatographie-Zubehör	18
2.2. Marine Organismen	19
2.2.1. Die Schwämme	19
2.2.1.1. Die Probenahme	19
2.2.1.2. Beschreibung der Sammelorte	21
2.2.2. Die Versuchsorganismen	22
2.2.2.1. Die Vorversuche	22
2.2.2.2. Die Versuchstiere	22
2.2.2.3. Fangorte- und methode	24
2.2.2.4. Der Transport und die Haltung der Fische	25

DER CHEMISCHE FRASSSCHUTZ DER MITTELMEERSCHWÄMME	26
2.3. Die Extraktion der Schwämme	26
2.4. Die Durchführung der Fütterungsversuche mit den Rohextrakten	27
2.4.1. Die Herstellung des Futters	28
2.4.2. Der Ablauf und die Auswertung der Fütterungsversuche	29
2.5. Die Nährstoffanalyse	30
 DIE FRASSSCHUTZMETABOLITEN DES SCHWAMMES <i>APLYSINA CAVERNICOLA</i>	 32
2.6. Methoden zur Fraktionierung des Rohextraktes	32
2.6.1. Das Ausschütteln mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität	32
2.6.2. Chromatographische Methoden	33
2.6.2.1. Die Dünnschichtchromatographie (DC)	33
2.6.2.2. Die Säulenchromatographie	34
2.7. Methoden zur Identifizierung der Extraktkomponenten und zur Reinheitsprüfung	35
2.7.1. Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	35
2.7.2. Die NMR-Spektroskopie	36
2.8. Die Fraktionierung des Extraktes	37
2.9. Die Fütterungsversuche mit den Fraktionen des Rohextraktes	40
2.10. Quantifizierung der Reinsubstanzen in den Rohextrakten	40
2.10.1. Die Ermittlung der Eichgeraden	41
2.10.2. Die Bestimmung der Metabolitenkonzentration im Schwammgewebe	41
2.11. Die Fütterungsversuche mit den Reinsubstanzen	42

3. Ergebnisse	43
3.1. Die Auswahl der Versuchstiere	43
3.2. Die gesammelten Schwämme	45
DER CHEMISCHE FRASSSCHUTZ DER MITTELMEERSCHWÄMME	51
3.3. Die erhaltenen Rohextraktmengen aus den Schwämmen	51
3.4. Die fraßhemmende Wirkung der Rohextrakte	52
3.5. Der Zusammenhang zwischen der Fraßhemmungsaktivität der Rohextrakte und dem Nährstoffgehalt der Schwämme	55
DIE FRASSSCHUTZMETABOLITEN DES SCHWAMMES <i>APLYSINA CAVERNICOLA</i>	57
3.6. Die Fraktionen des Extraktes	57
3.7. Erhaltene Reinsubstanzen	60
3.8. Die Konzentrationen der Metaboliten im Schwammgewebe	60
3.9. Die fraßhemmende Wirkung der isolierten Reinsubstanzen	63
4. Diskussion	65
DER CHEMISCHE FRASSSCHUTZ DER MITTELMEERSCHWÄMME	71
DIE FRASSSCHUTZMETABOLITEN DES SCHWAMMES <i>APLYSINA</i> <i>CAVERNICOLA</i>	83
5. Literaturverzeichnis	95
6. Zusammenfassung	106
7. Abkürzungsverzeichnis	108
8. Anhang	109

1. Einleitung

1.1. Schwämme in ihrem Lebensraum

Meist kann sich der „Normalbürger“ unter dem Begriff Schwamm nur das beige gefärbte Sponginskelett von *Spongia officinalis*, den Badeschwamm vorstellen. Der Taucher entdeckt jedoch schnell, wie vielfältig geformt und gefärbt die Organismen des Tierstammes der Porifera sind. Tatsächlich sind die Schwämme in der Besiedelung aller aquatischen Lebensräume der Erde außerordentlich erfolgreich und haben sich in unterschiedlichster Form an ihre Lebensräume angepaßt.

Ihre Verbreitung erstreckt sich von den Polarmeeren (Barthel & Gutt 1992, Dayton et al. 1974) bis in die Tropen (Reiswig 1973, Rützler 1978, Wenner et al. 1983, Suchanek et al. 1985). Schon im Kambrium (vor ca. 580 Millionen Jahren) besiedelten sie die Meere und gehören damit zu den ältesten mehrzelligen Organismen unserer Erde. Weltweit sind etwa 8000 rezente Schwammarten beschrieben (van Soest 1996), aber taxonomische Unklarheiten erschweren zuverlässige Aussagen über die tatsächliche Anzahl (Rützler 1978).

Durch den ungegliederten Körperbau der Schwämme und ihre sessile Lebensweise wurden sie erst sehr spät als Tiere erkannt. Sie besitzen keine echten Organe, kein Nervensystem, kein Blutkreislaufsystem und keine Muskelzellen. Jedoch gibt es unterschiedlich ausdifferenzierte Einzelzellen, die in der Lage sind, je nach Bedarf spezielle Funktionen zu erfüllen. Hierbei finden auch morphologische Wandlungen der Zellen statt (van Soest 1996).

Die äußere Form der Schwämme ist stark von den Einflüssen der Umgebung beeinflusst. Eine grobe Einteilung kann in strauch-, klumpen und krustenförmige Arten gemacht werden. Häufig bilden Schwämme koloniale Verbände, in denen sich Einzelindividuen kaum voneinander unterscheiden (van Soest 1996).

Ein Großteil des Schwammkörpers besteht aus dem Mesohyl, einem lockeren Stützgewebe mit einem hohen Anteil an Interzellularräumen, in das die funktionellen Zellen eingelagert sind. Gestützt wird das Mesohyl durch ein Skelett aus mineralischen Nadeln (Spicula) und/oder Fasern eines kollagenen Glykoproteins, dem Spongin. Man unterscheidet anhand der Skelettmaterialien drei Taxa der Schwämme:

Die Hexactinellidae, zu deutsch Glasschwämme, besitzen Spicula aus Silicat. Bei den Calcarea, den Kalkschwämmen bestehen die Nadeln aus Kalk. Die Demospongiae (Hornschwämme) haben keine oder nur wenige Spicula. Statt dessen stützen zähe Sponginfasern ihr Gewebe.

Wassergefüllte Kanäle, die das Mesohyl durchziehen, machen meist einen großen Teil des Schwammvolumens aus und vergrößern die Oberfläche des Schwammes um ein Vielfaches. Innerhalb dieser Kanäle findet die Nahrungsaufnahme des Schwammes statt.

Durch den Schlag einer Vielzahl von Flagellen wird dazu ein Wasserstrom durch das Kanalvolumen erzeugt. Auf diese Weise wird Umgebungswasser in die Ostien, kleine Poren an der Oberfläche, in den Schwamm eingesogen und durch spezielle Kammern, die Choanocysten, geleitet. Hier filtrieren die Reusen spezialisierter Zellen, der Kragengeißelzellen, Nahrungspartikel in Form von kleinsten Zellen (Pico- und Nanoplankton) und kolloidalen Molekülen aus dem Wasser (van Soest 1996, Reiswig 1974, 1981). Diese werden dann phagocytotisch aufgenommen und verdaut. Gleichzeitig diffundiert Sauerstoff in die Zellen des Schwammes.

Anschließend wird das Wasser in großen Ausströmöffnungen, den Oscula, gesammelt und wieder aus dem Schwammkörper abgegeben. Auf diese Weise transportieren Schwämme täglich immense Wassermengen durch ihren Körper und filtrieren dabei große Mengen an Nahrung. Ist der Anteil an Nahrungsteilchen oder anderen Partikeln im Meerwasser jedoch zu hoch, kann dies zum Verstopfen der Ostien führen.

Neben der Filtration des Meerwassers spielen Symbionten bei der Nahrungsversorgung der Schwämme eine wichtige Rolle. Bei manchen Schwammarten wurde ein Anteil der Symbionten von über 40 % an der gesamten Biomasse gemessen (Vacelet 1975). Bakterien, Cyanobakterien und einzellige Grünalgen, die Dinoflagellaten sind dabei die wichtigsten Organismengruppen, die mit Schwämmen in Symbiose leben. Photoautotrophe Organismen wie Dinoflagellaten und Cyanobakterien können Ammoniak, ein Stoffwechselprodukt des Schwammes, zu Nitrit und anschließend zu Nitrat reoxidieren und machen so den in diesen Substanzen befindlichen Stickstoff wieder für ihren Wirt nutzbar. Darüber hinaus geben sie einen Teil der photosynthetisch fixierten Kohlenhydrate an den Schwamm ab (Rützler 1981, Ott 1996, Wilkinson 1983).

Bakterien können organische Moleküle aus dem Wasser aufnehmen, die sie teilweise an ihren Wirt weitergeben, womit sie die Nahrungsaufnahmeleistung des Schwammes zusätzlich erhöhen (van Soest 1996).

Durch die effiziente Filtrierung kleinster Partikel aus dem Meerwasser und die Nährstoffversorgung durch ihre Symbionten, können Schwämme große Mengen an wertvollen Substanzen in ihrem Gewebe akkumulieren. Sie tragen damit, vor allem in oligotrophen Gewässern, wesentlich zur Nährstofffixierung im Benthos bei (Schubauer et al. 1991).

1.2. Der chemische Faulschutz der Schwämme

Wird ein Stück Holz oder Plastik dem Meerwasser ausgesetzt, so läßt sich innerhalb kürzester Zeit beobachten, wie Algen, Muscheln, Napfschnecken und verschiedene andere Organismen die neu verfügbare Oberfläche besiedeln. Mobile Fortpflanzungsstadien von marinen Pflanzen und Tieren sind im Meer allgegenwärtig und sobald sich ihnen ein fester Untergrund bietet, haften sie sich an und beginnen sich zu entwickeln. Dieser Prozeß, Fouling genannt, gliedert sich in drei Schritte (Bakus et al. 1986):

Zunächst lagern sich verschiedene Glykoproteine an die Oberfläche an (Lewin 1984). Die dadurch entstehende Nahrungsgrundlage wird durch Bakterien, Diatomeen und Protozoen genutzt, die sich ansiedeln und dabei einen „Primären Film“ bilden (Lappin-Scott & Costerton 1989). In diesen können sich dann, im dritten Schritt, die Sporen makrophytischer Algen und die Larven epibiontischer Invertebraten einnisten und sich entwickeln (Crisp & Ryland 1960).

Für den Schwamm wäre ein solcher Prozeß auf seiner Oberfläche fatal. Pathogene Substanzen, die von den Bakterien des „Primären Films“ ausgeschieden werden, würden zum Absterben der befallenen Gewebeteile führen (Correa & Sanchez 1996). Auf dem Schwamm wachsende Epibionten wären direkte Nahrungskonkurrenten und würden zudem die Ostien verstopfen. Wasser könnte nicht mehr eingesogen werden und der Schwamm würde letztendlich an Sauerstoff- und Nahrungsmangel sterben.

Tatsächlich läßt sich nur selten Bewuchs auf Schwammoberflächen beobachten (Jackson & Buss 1975). Und obwohl Bakterien im Meerwasser allgegenwärtig sind, ist die Außenhaut der Schwämme häufig nahezu steril (Becerro et al. 1994).

Um dieses Phänomen zu ergründen, führte Thompson (1985) Untersuchungen am Schwamm *Aplysina fistularis* durch. Aquariumsversuche ergaben, daß der Schwamm ständig Sekundärmetaboliten an das Umgebungswasser abgibt.

Bioaktivitäts-Tests mit den abgegebenen Substanzen zeigten, daß diese Metaboliten effektiv die Besiedelung des Schwammes durch Algen und Invertebraten verhindern können (Thompson 1985, Thompson et al. 1985, Walker et al. 1985). Ähnliche Untersuchungen mit anderen Schwammarten bestätigen diese Erkenntnis (Martin & Uriz 1993, Becerro et al. 1997a, Bakus et al. 1994, McCaffrey & Endean 1985).

Es wurde beobachtet, daß die Sekundärmetaboliten nicht nur als Infektionsschutz gegen Bakterien eingesetzt werden, sondern daß sich die Schwämme durch ihren Einsatz diese Organismen sogar als Nahrung verfügbar machen (Bergquist & Bedford 1978, Green 1977a). Durch die Abgabe bioaktiver Sekundärmetaboliten verklumpen die durch die Ostien eingestrudelten Bakterien. Während sie sonst aufgrund ihrer geringen Größe die Reusen der Kragengeißelzellen passieren würden, lassen sie sich so aus dem Wasser filtrieren und können vom Schwamm aufgenommen werden.

1.3. Biologische Waffen im Einsatz gegen Raumkonkurrenten

Häufig wachsen Schwämme in direkter Nachbarschaft von anderen sessilen Invertebraten auf Felsen und Korallenriffen. Sie selbst sind dort oft in großer Diversität und Abundanz vertreten (Targett & Schmahl 1984, Suchanek et al. 1985). Von Schmahl (1991) wurden auf einem Riff vor den Keys, einer Inselkette im Süden Floridas, Messungen zum Bestand der dort ansässigen Schwämme durchgeführt. Er zählte im Durchschnitt 10,45 Arten und 17,45 Individuen pro Quadratmeter. Unter solchen Bedingungen herrscht zwischen den dort lebenden sessilen Invertebraten eine extreme Raumkonkurrenz (Lalli & Parsons 1997). Nur wer seinen Nachbarn in Schach halten kann und in der Lage ist, zu verhindern, verdrängt oder überwachsen zu werden, kann sich hier auf Dauer durchsetzen. Diese Disziplin, Allelopathie genannt, beherrschen

Schwämme meisterhaft. Sie besitzen ein riesiges Arsenal an bioaktiven Sekundärmetaboliten, mit denen sie ihre Gegner im Kampf um Raum außer Gefecht setzen können (Porter & Targett 1988, Suchanek et al. 1985, Turon et al 1996).

Der Einsatz solcher Metabolite läßt sich häufig an einer scharf abgegrenzten Zone, einem abiotischen Saum im Randbereich der Schwämme erkennen (Mebs 1989). Ein bekanntes Beispiel für die aggressive Anwendung von allelopathisch wirksamen Sekundärmetaboliten sind die Schwämme der Gattung *Siphonodictyon*. Sie bohren tiefe Löcher in lebende Korallenstöcke. Um die in ihrer Umgebung wachsenden Korallenpolypen zu verdrängen und nicht ihrerseits von ihnen überwachsen zu werden, vergiften sie die Photosynthese ihrer Symbionten mit dem Sesquiterpen Siphonodictidin (Sullivan et al. 1983).

Aber nicht nur gegen ihre adulten Konkurrenten, auch schon gegen deren Larven setzen die Schwämme ihre chemischen Waffen ein, um ausreichend Platz für ihr eigenes Wachstum zu haben. So stellte Goodbody (1961) eine starke Verminderung des Larven-Recruitments innerhalb schwammdominierter Gemeinschaften fest. Sehr wahrscheinlich läßt sich diese Verminderung auf die Abgabe von bioaktiven Schwammetaboliten an das Umgebungswasser zurückführen, wie Thompson (1985) sie für *Aplysina fistularis* beschrieben hat.

1.4. Der Schutz der Schwämme vor Fraßfeinden

Schwämme akkumulieren große Mengen wertvoller Nährstoffe in ihrem Gewebe (Schubauer et al. 1991). Damit werden sie für eine Vielzahl von mobilen Räubern zu einer attraktiven Beute. Neben Fischen (Randall & Hartmann 1968, Wulff 1994) kommen dabei Mollusken (Thompson 1976, Proksch 1994, Cattaneo-Vietti 1993, Kernan 1988), Echinodermen (Uriz et al 1996), Polychaeten (Pawlik 1983) und sogar Wasserschildkröten (Meylan 1988) in Frage.

Erstaunlicherweise zeigen die wenigsten Schwammarten nennenswerte Fraßschäden (Paul 1992, Bakus 1981, Pawlik 1995, Wadell 2000). Dies ist vor allem in Anbetracht der Tatsache, daß sie häufig in oligotrophen Lebensräumen leben, überraschend, da hier fast immer ein hoher Fraßdruck herrscht (Grigg et al. 1984, Huston 1985). So

wurden von Carpenter (1986) in einem tropischen Korallenriff 150 000 Fischbisse pro Quadratmeter und Tag gezählt. Doch den wenigsten davon scheinen die Schwämme zum Opfer zu fallen.

Randall & Hartmann (1968) untersuchten den Mageninhalt von 212 karibischen Fischarten. Sie fanden nur elf Spezies, bei denen Schwammgewebe mehr als 6 Prozent der gesamten Nahrung ausmacht. Bei fünf dieser elf Arten hatte Schwammmaterial einen Anteil von über 50 Prozent am Mageninhalt.

Die Filtration von Nahrungspartikeln aus dem Meerwasser bedingt, daß für viele Schwammarten die ständige Nachlieferung frischen, nährstoffhaltigen Wassers erforderlich ist (Vogel 1977). Da durch einen festen Panzer der Wasseraustausch mit der Umgebung stark beeinträchtigt werden würde, ist es für die Schwämme nicht möglich, sich durch einen derartigen Schutz gegen ihre Fraßfeinde zu wehren. Auch die Besiedelung versteckter Standorte in Felshöhlen bringt häufig Nachteile, da hier meist ein geringerer Austausch des Umgebungswassers als an der Oberfläche der Felsen stattfindet (Vogel 1977). Schwämme an exponierten Standorten sind also im Normalfall begünstigt. Gleiches gilt für Schwämme, die von den Photosyntheseprodukten ihrer Symbionten abhängig sind (Arillo et al. 1993). Um sie mit ausreichender Lichtintensität zu versorgen, ist auch hier ein exponierter Standort vorteilhaft. Damit haben die Schwämme kaum Möglichkeiten, sich auf mechanischem Weg oder durch Tarnung zu schützen. Sie müssen also andere Abwehrsysteme entwickelt haben, um sich gegen ihre Fraßfeinde zu wehren.

Nachdem entdeckt worden war, daß nur wenige Spezialisten nennenswerte Mengen an Schwammgewebe fressen, und damit Predation durch Fische auf Schwammpopulationen kaum Einfluß hat (Randall & Hartmann 1968), wuchs Anfang der siebziger Jahre das Interesse an der Ökologie der sessilen marinen Invertebraten. Thompson stellte 1976 fest, daß auch die wenigen auf das Fressen von Schwämmen spezialisierten Nacktschnecken höchstens kleine lokale Schäden verursachen können. Immer häufiger wurden Toxine aus Schwämmen isoliert (Bakus & Green 1974, Fattorusso & Sodano 1972) und so war die Idee naheliegend, daß sich Schwämme, ähnlich wie terrestrische Pflanzen (McKey 1974, Feeny 1976), mit Hilfe ihrer Sekundärmetaboliten vor Predation schützen (Green 1977b). Bakus (1981) stellte bald

einen Zusammenhang zwischen sessiler, bzw. langsambeweglicher Lebensweise und dem Vorhandensein toxischer Substanzen fest. Er verglich außerdem exponiert und kryptisch lebende marine Invertebraten hinsichtlich ihrer toxischen Substanzen miteinander und stellte fest, daß ein wesentlich größerer Anteil der exponierten Arten giftig für Fische ist. Green (1977b) erkannte einen Zusammenhang zwischen der Diversität der Fische an einem Standort und dem Ausmaß der Toxizität der Sekundärmetaboliten der dort lebenden sessilen Invertebraten.

In der Folge wurde eine Vielzahl an Untersuchungen zur ökologischen Funktion der Sekundärmetaboliten mariner Invertebraten durchgeführt. Ein Überblick über die Ergebnisse bietet beispielsweise die von Bakus et al. (1986) publizierte Arbeit. In vielen Fällen stellte man fest, daß die gefundenen Substanzen den Invertebraten in verschiedener Hinsicht nützlich sind. So gibt es Substanzen, die vor einem großen Spektrum an potentiellen Predatoren schützen können und gleichzeitig den Befall durch Mikroorganismen und die Verdrängung durch Konkurrenten verhindern (Thacker 1998, Pennings et al. 1994).

Schwämme haben mit ihren bioaktiven Sekundärmetaboliten also sozusagen ein Allheilmittel entwickelt. Sie verschaffen ihnen Vorteile im Kampf um den meist knappen Raum, der ihnen für ihr Wachstum zur Verfügung steht. Sie halten ihre Oberfläche frei von Bewuchs und sorgen so dafür, daß ihre Nahrungs- und Sauerstoffaufnahme stets aufrecht erhalten werden kann. Sie unterstützen die Effizienz ihrer Nahrungsaufnahme, indem sie Bakterien als Nahrung verfügbar machen und vor allem dienen sie als wirksamer Fraßschutz gegen die Vielzahl an Predatoren, denen die Schwämme sonst wohl ungeschützt ausgeliefert wären.

Der Preis, den die Besitzer der Sekundärmetaboliten für diesen Schutz zahlen müssen, ist die Investition von Ressourcen in ihren Aufbau. Diese Ressourcen müssen bei Wachstum und Fortpflanzung eingespart werden (Uriz et al. 1996, Bakus 1981). Aber wie sich im Laufe der nun schon beinahe 600 Millionen Jahre andauernden sehr erfolgreichen Entwicklung der Schwämme gezeigt hat, lohnt sich der Einsatz.

1.5. Die verletzungsinduzierte Abwehrreaktion der Schwammfamilie Aplysinidae

Eine für Schwämme ganz besondere Form des chemischen Schutzes wurde 1993 von Teeyapant & Proksch entdeckt. Sie stellten fest, daß es bei *Aplysina aerophoba*, einem mediterranen Vertreter der Schwammfamilie Aplysinidae, bei Verwundung des Gewebes zu einer enzymatischen Transformation der im unverletzten Schwammgewebe vorhandenen Schwammmetaboliten kommt. Die bromierten Alkaloide Isofistularin-3 und Aerophobin-2 reagieren dabei zunächst zum niedrigermolekularen Aeroplysinin-1, das in einem weiteren Schritt zu Dienon umgewandelt wird (Abb.1.1.).

Es konnte nachgewiesen werden, daß diese wundinduzierte Biotransformation einen starken Anstieg der biologischen Aktivität mit sich bringt (Teeyapant et al. 1993). So zeigten sich bei den Produkten der Enzymreaktion, dem Aeroplysinin-1 und dem Dienon, stark antibiotische Eigenschaften gegenüber terrestrischen Bakterien. Beide Substanzen wirken außerdem mutagen, hämolytisch und zeigten eine ausgesprochene Cytotoxizität. Im Gegensatz dazu erwiesen sich bei denselben Biotests äquimolare Mengen der Vorstufen Aerophobin-2 und Isofistularin-3 entweder nur gering oder überhaupt nicht bioaktiv.

Auch gegenüber marinen Organismen zeigte sich eine starke Bioaktivität der Metaboliten Dienon und Aeroplysinin-1. So hemmten sie das Zellwachstum aller 16 in der Arbeit von Weiss (1995) getesteten Stämme mariner Bakterien und zweier mariner Algenarten. Die höhermolekularen Vorstufen zeigten kaum Aktivität gegenüber den getesteten Organismen.

In Tests mit *Littorina littorea* zeigten sich, nachdem Dienon und Aeroplysinin-1 in das Aquariumswasser der Meeresschnecken gegeben worden war, deutliche Verhaltensänderungen der Versuchstiere, die auf eine abschreckende Wirkung der Substanzen schließen lassen. Aerophobin-2 führte zu deutlich schwächeren Reaktionen (Weiss 1995).

Bei Fütterungsversuchen mit dem karibischen Riffisch *Thalassoma bifasciatum* ergab sich für ein Gemisch aus Dienon und Aeroplysinin-1 eine stärker fraßhemmende Wirkung gegenüber den Versuchsfischen als für ein Gemisch aus Aerophobin-2,

Isofistularin-3 und Aplysinamisin-1, einem weiteren Metaboliten des Schwammes *A.aerophoba*.

Man interpretierte diesen durch Verletzung des Gewebes ausgelösten Anstieg in der Bioaktivität als eine wundinduzierte chemische Abwehrreaktion des Schwammes (Teeyapant & Proksch 1993, Ebel et al. 1997). Analoge Abwehrreaktionen sind bei höheren Pflanzen schon seit längerem bekannt (Bailey & Mansfield 1982, Jones 1988), doch für Schwämme stellt diese Reaktion ein Novum dar (Proksch & Ebel 1998).

Ebel et al. (1997) stellten fest, daß die Biotransformation von Aerophobin-2 und Isofistularin-3 außer mit dem Enzymextrakt von *A.aerophoba* auch unter Einsatz von Enzymextrakten anderer Schwämme der Familie Aplysinidae stattfindet. Wurden diese Substanzen hingegen mit Enzymextrakten von Schwämmen anderer Familien zusammengebracht, blieb eine Transformation aus. Man schloß daraus, daß es sich bei dieser Form der Enzymaktivität um ein familienspezifisches Charakteristikum der Aplysinidae handelt.

Obwohl die Produkte der Biotransformation stets Aeroplysinin-1 und Dienon sind, gibt es Unterschiede bei den Substraten der Enzymreaktion zwischen den Schwammarten der Familie Aplysinidae. So stellte Brenzinger (1996) fest, daß bei *Aplysina cavernicola*, einem weiteren mediterranen Vertreter der Aplysinidae, Aerothionin statt dem Isofistularin-3 als Vorstufe in die Biotransformation eingeht. In der gleichen Arbeit wurde festgestellt, daß bei *A.cavernicola* zusätzlich zum Aerothionin auch die bromierten Alkaloide Aplysinamisin-1 und Aerophobin-2 als Substrate der Enzymreaktion zu Aeroplysinin-1 und Dienon verwendet werden (Abb.1.2.).

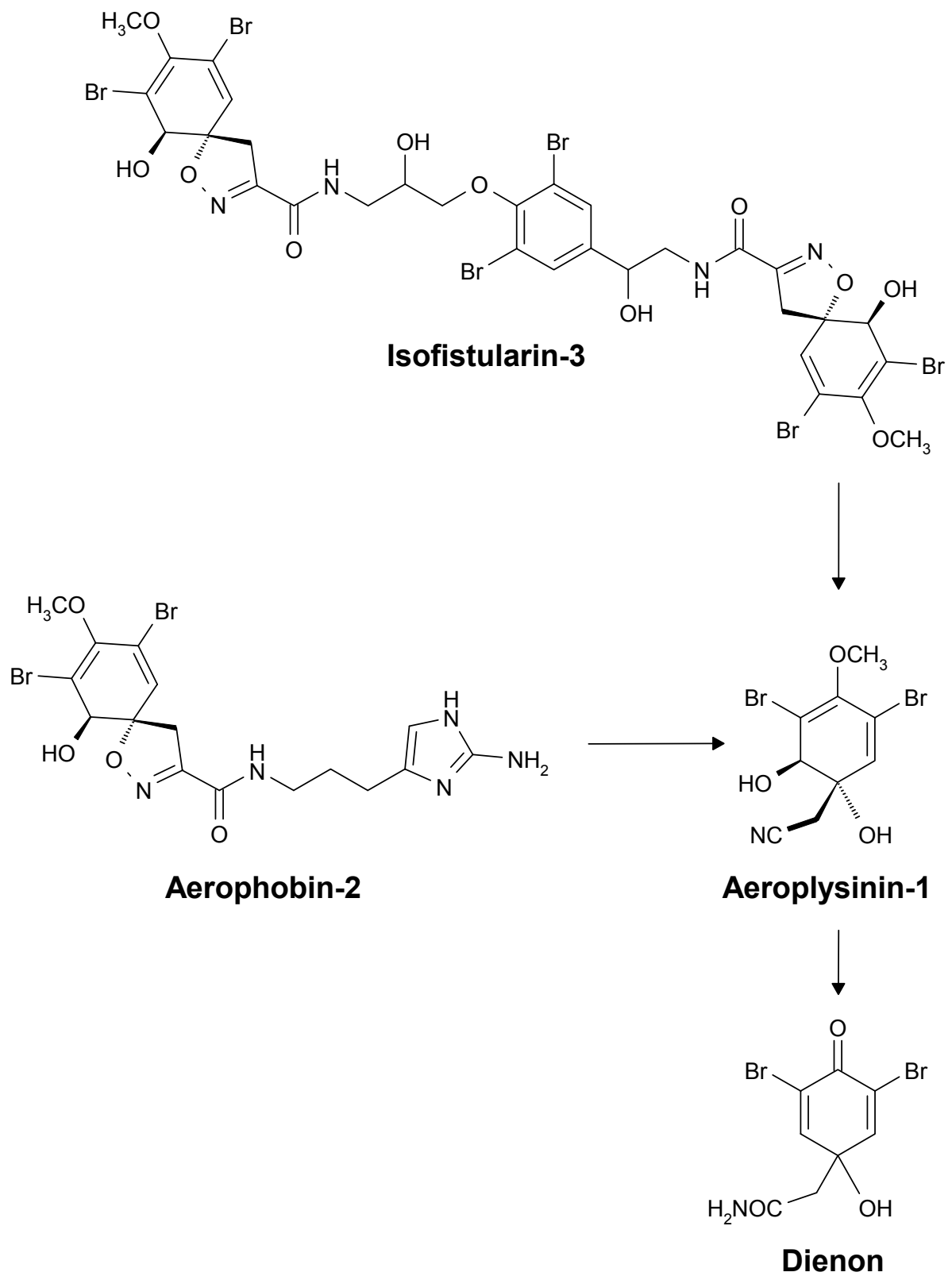


Abb.1.1.: Die verletzungsinduzierte Biotransformation der Sekundärmetaboliten bei *Aplysina aerophoba*

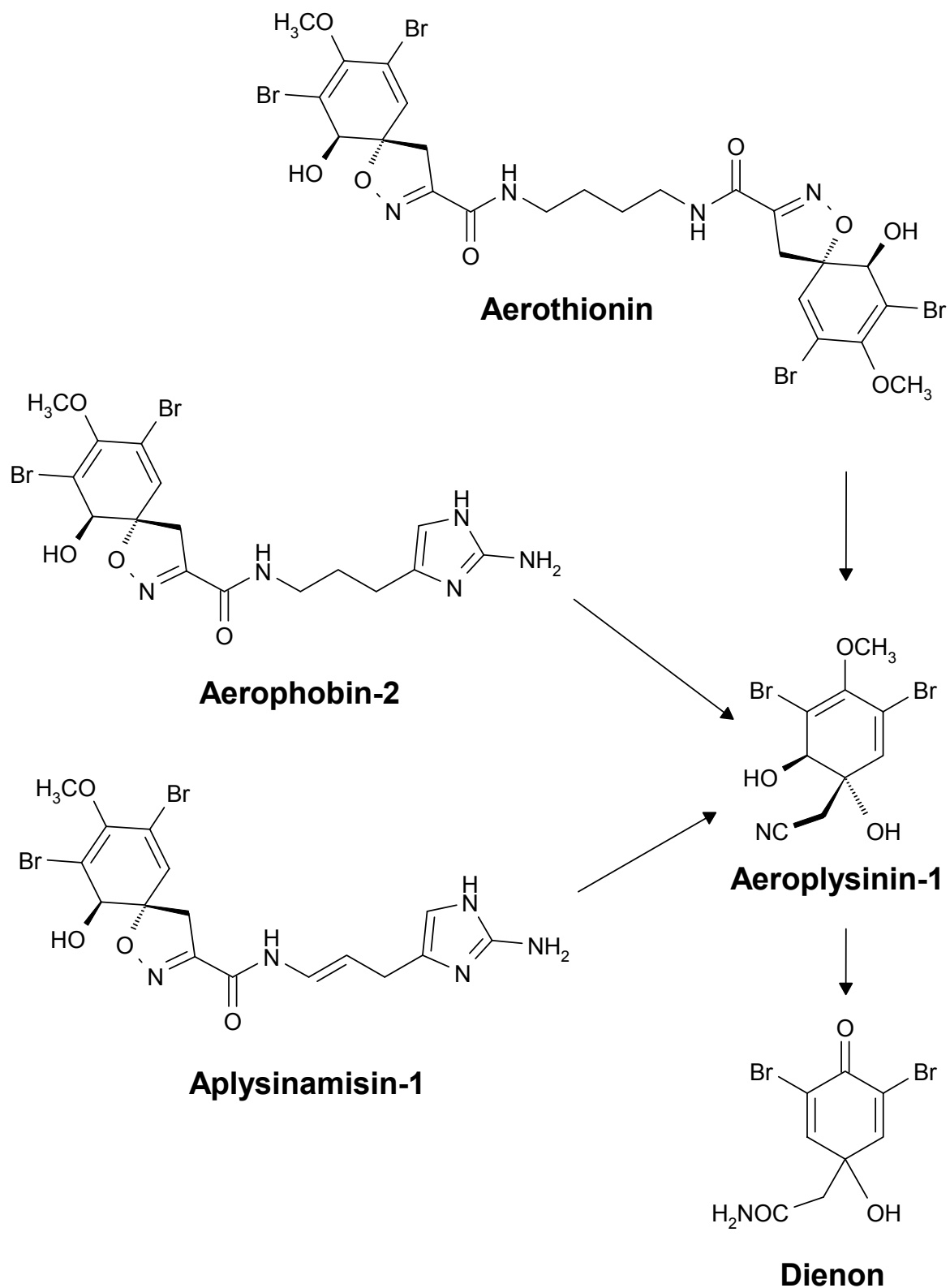


Abb.1.1.: Die verletzungsinduzierte Biotransformation der Sekundärmetaboliten bei *Aplysina cavernicola*

1.6. Der Ursprung der Schutzsubstanzen

In vielen Fällen ist bisher nicht sicher, ob die Schwämme tatsächlich ihre eigenen Ressourcen in die Produktion ihrer Schutzsubstanzen investieren oder ob sie nicht vielmehr Metaboliten anderer Organismen für ihre Zwecke nutzen. So werfen die Tatsache, daß ein großer Teil der Nahrung der Schwämme aus marinen Mikroorganismen besteht (van Soest 1996) und die Beobachtung, daß Schwämme häufig symbiontische Mikroorganismen beherbergen (Althoff et al. 1998, Unson & Faulkner 1993, Vacelet 1995) die Frage auf, wer tatsächlich für die Produktion der bioaktiven Substanzen verantwortlich ist.

Es ist bekannt, daß marine Mikroorganismen wie Dinoflagellaten und Bakterien häufig stark toxische Metaboliten enthalten, die teilweise auch für Vergiftungen des Menschen, die aus dem Genuß von Muscheln und Fisch resultieren, verantwortlich sind (Kodama et al. 1988, Steidinger & Baden 1984, Shimizu 1987). Der Verdacht, daß die Schwämme die bioaktiven Metaboliten dieser Mikroorganismen nutzen, indem sie sie in ihrem eigenen Gewebe akkumulieren, liegt damit nahe. In den meisten Fällen ist der tatsächliche Ursprung der aus den Schwämmen isolierten Substanzen noch nicht bekannt. Einige Arbeiten konnten aber schon zeigen, daß manche der Schwammsymbionten tatsächlich einige der Inhaltsstoffe enthalten, die von ihren Wirten eingesetzt werden könnten, um sich in ihrem Lebensraum durchzusetzen (Althoff et al. 1998, Bewley et al. 1996)

1.7. Medikamente aus dem Meer

Die Nutzung von Naturstoffen aus terrestrischen Pflanzen hat eine lange Tradition. Schon in der frühen Geschichte des Menschen nutzte man Kräuter und Pflanzenteile um Wunden zu heilen und Schmerzen zu lindern. Im Laufe des vorigen Jahrhunderts beschäftigte man sich eingehend mit der Chemie der Heilpflanzen, isolierte Tausende verschiedener Naturstoffe (Joffe & Thomas 1989) und untersuchte auch deren ökologischen Nutzen für die Pflanzen. Man stellte fest, daß ein großer Teil dieser

Substanzen den Pflanzen als Fraßschutz gegen Herbivore dient (Feeny 1976, McKey 1974, Stahl 1904, Rhoades & Cates 1976).

In den letzten drei Jahrzehnten wurden auch aus marinen Invertebraten Tausende neuer Naturstoffe isoliert (Faulkner 1997, Scheuer 1978-1983). Analogien zwischen dieser Tiergruppe und terrestrischen Pflanzen lassen auch hier eine ergiebige Quelle bioaktiver Substanzen erwarten (Paul 1992). So sind sowohl terrestrische Pflanzen als auch sessile marine Invertebraten nicht in der Lage, vor mobilen Fraßfeinden zu flüchten. Die Notwendigkeit, sich durch spezielle Mechanismen vor Fraß zu schützen, ergibt sich somit für beide Gruppen gleichermaßen. Während jedoch Pflanzenmaterial meist einen hohen Anteil an für Tiere schwer verwertbaren Nährstoffen enthält, sind Invertebraten in ihrer Zusammensetzung ihren Räubern vergleichsweise sehr ähnlich und ihre chemischen Bausteine sind damit für die Fraßfeinde gut nutzbar. Sie stellen damit eine noch attraktivere Nahrungsquelle als Pflanzen dar (Lalli & Parsons 1997). Umso mehr entsteht für diese sessilen Lebewesen die Notwendigkeit, Fraßschutzsubstanzen zu entwickeln (Bakus 1981).

Marine Invertebraten besiedeln alle Ozeane und Binnenmeere (van Soest 1996). Ihnen steht damit ein Lebensraum zur Verfügung, der über 70% der Erdoberfläche umfaßt und damit weit größer ist, als die Fläche, die terrestrische Pflanzen bewachsen können. Vor allem in Korallenriffen herrscht eine Diversität und Abundanz dieser Tiere, die im terrestrischen Bereich nur in tropischen Regenwäldern erreicht wird. Dies führt zu einer extremen Vielfalt an Spezialisierungen (Huston 1985, Mebs 1986).

Die ökologischen Bedingungen, wie beispielsweise Fraßdruck, Raumkonkurrenz usw. unter denen die Naturstoffe im Meer entstehen, übersteigen die an Land herrschenden Bedingungen zwar meist in ihrem Ausmaß, sind ihnen aber bis zu einem gewissen Grad ähnlich. Ganz anders verhält es sich für die chemischen und physikalischen Parameter. Hier sind wesentliche Unterschiede zwischen dem aquatischen und terrestrischen Lebensraum vorhanden. Aus diesen Unterschieden resultieren große Abweichungen zwischen den Strukturen der Naturstoffe, die in den jeweiligen Lebensräumen entstehen (Paul 1992)

Aus all diesen Gegebenheiten wird deutlich, welch riesiges Potential an Naturstoffen die marinen Invertebraten der pharmazeutischen Forschung bieten. Viele Substanzen, die aus Meeresinvertebraten isoliert wurden, durchlaufen bereits klinische Tests (Proksch 1994, Carté 1996, Müller & Schröder 1997, Munro et al. 1987). Darunter befinden sich Naturstoffe, die beispielsweise gegen Entzündungen, Krebs, AIDS und als Antibiotika eingesetzt werden könnten.

1.8. Die Ziele meiner Arbeit

Die Suche nach marinen Naturstoffen ist ein sehr aktuelles Forschungsgebiet, das in Deutschland sowohl von Pharmaunternehmen als auch vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert wird (bmb+f 1997). In Amerika werden bereits Massenscreenings durchgeführt, um das Auffinden wertvoller, pharmazeutisch einsetzbarer Substanzen zu beschleunigen (Homepage des National Cancer Institutes der Vereinigten Staaten von Amerika). Um jedoch gezielt auf die Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus marinen Invertebraten gehen zu können, und gleichzeitig in der Lage zu sein, die Arten und ihren Lebensraum vor Ausbeutung zu schützen, bedarf es eines umfangreichen Wissens über ihre Ökologie. So können Beobachtungen über die Art des Einsatzes bioaktiver Sekundärmetaboliten im natürlichen Lebensraum Ideen für deren Einsatzmöglichkeiten als Pharmakon liefern. Das Wissen über die ökologischen Zusammenhänge, die zur Produktion von Naturstoffen führen, kann nützlich sein, um das Ausmaß ihrer Bioaktivität und ihre Einsetzbarkeit in der Medizin vorherzusagen (Schupp 2000). Und nicht zuletzt kann die Kenntnis des Ökosystems und der darin stattfindenden Interaktionen dazu dienen, die Auswirkungen von Eingriffen in den Lebensraum der Invertebraten, die notwendig sind, um die Naturstoffe zu gewinnen, im vornherein zu überschauen. So können schonende Verfahren entwickelt und gewählt werden um damit die unschätzbare Quelle an neuen Medikamenten, die dieser Lebensraum bietet, dauerhaft zu erhalten.

Zu diesem Zweck sind bereits viele Untersuchungen im Gange. Hauptforschungsgebiete sind dabei aufgrund der großen Artenvielfalt und der hohen Dichte an Individuen, die dort vorzufinden sind, die tropischen Korallenriffe. Doch auch

im Mittelmeer leben viele sessile Tiere unter verhältnismäßig oligotrophen Bedingungen auf engem Raum zusammen. Die Bedingungen für die Entwicklung pharmazeutisch interessanter Naturstoffe sind also, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß, hier ebenfalls gegeben.

Der in der Literatur mit Abstand am häufigsten angenommene ökologische Nutzen der bioaktiven Sekundärmetaboliten ist der Schutz vor Predatoren (Pawlik et al. 1995). Ziel meiner Untersuchungen war es deshalb, einen Überblick über den chemischen Fraßschutz der häufigsten Schwammarten im westlichen Litoral der mediterranen Insel Elba zu erhalten. Hierzu sollte die Wirkung von Extrakten der Schwämme auf das Freßverhalten von potentiellen Predatoren untersucht werden. Anhand der gewonnenen Daten sollten dann eventuelle Zusammenhänge der Fraßschutzintensität mit Beobachtungen der Morphologie der Schwämme und ihres Lebensraumes diskutiert werden.

Der zweite Teil meiner Arbeit dient dazu, anhand eines Beispielschwammes den Ursprung des chemischen Fraßschutzes auf molekularer Ebene aufzuspüren. Hierzu war beabsichtigt, die Gesamtheit der Sekundärmetaboliten des Schwammes in Fraktionen aufzutrennen und anschließend in Fütterungsversuchen auf ihre fraßhemmende Wirkung hin zu testen. Anhand dieser Versuchsreihe sollten dann die für den Fraßschutz dieses Schwammes verantwortlichen Reinsubstanzen identifiziert und isoliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Chemikalien

2.1.1. Material für die Probennahme auf Elba

- Waage Soehnle Magnum
- Ethanol vergällt mit ca. 1% Ethylmethyleketon; Reinheit mind. 99,5%; Merck
- PE-Kunststoffbehälter 1000 ml
- PE-Kunststoffbehälter 60 ml

2.1.2. Material für die Haltung der Fische und die Fütterungsversuche

- Glas-Aquarium (BxHxT = 170 x 40 x 80 cm)
- Glas-Aquarium (BxHxT = 140 x 30 x 45 cm)
- Plastikwannen (BxHxT = 33 x 25 x 24 cm)
- Pumpe „The Pump 40“ Typ SPP40GJ-L mit Schlauchmaterial und Sprudelsteinen
- Aquarienfilter Sera Titan T
- Bakterienkultur Cycle Biologischer Aquariumzusatz
- Fischfutter TetraMarin Granulat für mittlere bis große Meerwasserfische
- Fliegengitter
- Wasserbad
- Agar-agar; Merck
- Methanol destilliert

2.1.3. Chemikalien und Geräte für die Extraktion und Fraktionierung

2.1.3.1. Chemikalien

- Ammoniak; Merck
- Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd); Merck
- Dichlormethan; CI *
- Cyclohexan; CI *
- Essigsäure (100%); Merck
- Ethanol; CI *
- Ethylacetat; CI *
- Dichlormethan; CI *
- Isopropanol; CI *
- LiCHrosolv-Methanol; Merck
- Methanol; CI *
- Nanopur-Wasser; Merck
- ortho-Phosphorsäure, 85 % p.a.; Merck
- Schwefelsäure (konz.); Merck

* Die mit CI gekennzeichneten Chemikalien wurden von der Chemikalienausgabe der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in technischem Zustand bezogen und vor Gebrauch destilliert.

2.1.3.2. Laborgeräte

- Exsikkator Glaswerk Wertheim
- Gefriertrockner LYOVAC GT2 mit Pumpe TRIVAC E
- Heizplatte IKA-Combimag RCT
- Labormixer Waring Commercial
- Magnetrührer Heidolph MR1000
- Digital-pH-Meter Knick 646
- Rotationsverdampfer Vacuubrand PC510

- Standard-Rührwerk Roth RZR 2021
- Trockenschrank Heraeus T5050
- Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK510 S
- UV-Lampe Camag (254 und 366 nm)
- Mikrowaage Sartorius MC-1 RC210P
- Waage Sartorius 1103
- Wasserbad IKA-WA
- Zentrifuge Heraeus Biofuge pico

2.1.3.3. Chromatographie-Zubehör

Dünnschichtchromatographie (DC)

- DC-Fertigplatte (Alufolie), Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.2mm Schichtdicke; Merck
- DC-Glaskammern verschiedener Größen
- Anisaldehydreagens bestehend aus:
 - 85ml Methanol
 - 10ml Essigsäure (100%)
 - 5ml Schwefelsäure (konz.)
 - 0,5ml 4-Methoxybenzaldehyd

Säulenchromatographie

- Kieselgel 60 (40 – 63µm Korngröße); Merck
- Sephadex LH-20 (25 - 100µm Korngröße); Sigma
- Säule 1; Glas (Länge 95cm; Innendurchmesser: 45mm)
- Säule 2; Glas (Länge 105cm; Innendurchmesser 29mm)
- Säule 3 und 4; Glas (Länge: 70cm; Innendurchmesser: 29mm)
- Fraktionssammler ISCO Retriever II

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

- Gynkotec-Anlage bestehend aus:
 - Säule Knauer Eurospher 100-C18 (5 µm; 125 mm x 4 mm)
 - Degaser Gynkotec GT 103
 - Pumpe Gynkotec M 480
 - Probengeber Gynkotec GINA 50
 - Photodioden-Array-Detektor Gynkotec UVD 340S
 - Steuerungs-Software: GynkoSoft Version 5.30

2.2. Marine Organismen

2.2.1. Die Schwämme

2.2.1.1. Die Probennahme

Sämtliche Schwämme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden tauchend gesammelt und entstammen dem Mittelmeer rund um den westlichen Teil der Insel Elba in Italien. Die Tauchplätze (siehe 2.2.1.2.) wurden den Empfehlungen des Personals des Hydra-Instituts für Meereswissenschaften entsprechend ausgewählt.

Je nach Beschaffenheit des Schwammgewebes wurden die Schwämme vom Untergrund abgepflückt oder mit einem Tauchermesser abgeschnitten. Anschließend wurden sie nach Arten getrennt in sterile, chemikalienbeständige Kunststoffbeutel gegeben. Diese wurden noch am Ort der Probennahme luft- und wasserdicht verschlossen. Die jeweiligen Wassertiefen wurden mit dem Tauchcomputer ermittelt und aufgezeichnet. Beobachtungen zum Standort der Schwämme wurden ebenfalls notiert.

Nach Rückkehr zur meeresbiologischen Station wurden die Notizen zu den Schwämmen durch verschiedene Parameter wie Farbe, Wuchsform und Beschaffenheit des Gewebes ergänzt. Dann wurden die Proben vermessen und konserviert:

Zunächst wurden die Schwämme in ein Becherglas mit möglichst geringem Umfang überführt. Um Luftkontakt, und damit den Einschluß von Luftbläschen in das Schwammgewebe zu vermeiden, fand dies innerhalb einer mit Meerwasser gefüllten Wanne statt. Nachdem der Wasserstand am Becherglas angezeichnet worden war, wurde der Schwamm entnommen und sofort auf eine Waage gegeben um das Feuchtgewicht zu bestimmen. Mit Hilfe eines Meßzylinders wurde der Wasserstand des Becherglases wieder auf den Pegelstand vor Schwammentnahme aufgefüllt und das dazu benötigte Volumen an Meerwasser notiert. Das Schwammvolumen ergab sich aus dem zum Auffüllen des Becherglases benötigten Volumen an Wasser.

Der Großteil der Schwammgewebe wurde anschließend in 1000ml-Schraubdeckelgefäße gegeben und in Ethanol konserviert. Diese Behälter wurden dann im Kühlschrank gekühlt.

Kleinere Proben sollten später der taxonomischen Einordnung, der Nährstoffgehaltbestimmung und der Extraktion ohne Einfluß des Konservierungsmittels Ethanol dienen. Sie wurden mit Messer und Schere zerteilt und in kleinen 60ml-Schraubdeckelgefäßen direkt eingefroren.

Alle Proben wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie in Düsseldorf bis zur weiteren Bearbeitung in Gefriertruhen bei -20°C gelagert.

Die taxonomische Einordnung der gesammelten Proben führte Dr. R.W. van Soest vom Zoologischen Museum der Universität Amsterdam durch.

2.2.1.2. Beschreibung der Sammelorte

Die Bucht von Sant'Andrea

Die Bucht liegt unterhalb der kleinen Ortschaft Sant'Andrea im Nordwesten der Insel Elba. Ein Sandstrand, der zu beiden Seiten durch Felsen, im Westen zusätzlich durch eine Mole begrenzt wird, trennt den Ort vom Meer. Die Tauchgänge führten links an der Mole die Sandfläche in nördlicher bis nordnordwestlicher Richtung hinab bis in maximal 15m Tiefe. Der sandige Untergrund wird hier von Seegraswiesen und Felsblöcken aus dem für Elba charakteristischen Plutonit durchbrochen. Viele der Felsen und vor allem die schattigen Felsüberhänge sind von biogenem Kalk überzogen und beherbergen eine reiche Fauna.

Die Scoglio della Triglia

Die "Triglia" ist eine kleine Felsinsel, die ausschließlich mit dem Boot erreicht werden kann. Sie liegt in der Bucht von Marina di Campo im Süden Elbas. Das Sammelgebiet befand sich nördlich der Insel in einer Tiefe von 10 bis 20m und bestand aus einem Blockfeld, aus Steilwänden und einem schmalen Canyon.

Das Capo di Fonza

Hierbei handelt es sich um eine Felswand, die am östlichen Ende der Bucht von Marina di Campo steil bis in eine Tiefe von über 40m abfällt. An ihrem Grund befindet sich ein Sandfeld.

In den vielen Furchen und auf den Fortsätzen der stark zerklüfteten Wand wachsen viele Schwammspezies in direkter Nachbarschaft zu einer großen Zahl anderer sessiler Invertebraten.

2.2.2. Die Versuchorganismen

2.2.2.1. Die Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es zum einen, die von Schupp et al. (1999) entwickelte Methode zur Durchführung von Fraßexperimenten mit Extrakten aus marinen Invertebraten für die auf Elba vorhandenen Bedingungen zu optimieren. Vor allem aber sollten verschiedene Tiere aus dem Lebensraum der Schwämme auf ihre Eignung für die Experimente getestet werden.

Die Tiere wurden in mit frischem Seewasser befüllten Kunststoffwannen und Aquarien gehalten. Für eine ausreichende Belüftung sorgte eine Aquarienluftpumpe.

Für die Herstellung der Futterstücke, die in den Vorversuchen eingesetzt wurden, stellte mir mein Kollege Jan Hiort Extrakte aus Schwämmen, die im Vorjahr gesammelt worden waren, zur Verfügung (näheres zur Futterherstellung siehe 2.4.).

Als Versuchstiere wurden Fische der Spezies *Coris julis*, *Tripterygion tripteronotus* und verschiedene Arten der Gattung *Blennius* gefangen. Außerdem wurde der Seeigel *Paracentrotus lividus* gesammelt.

2.2.2.2. Die Versuchstiere

Coris julis (Meerjunker)

Bei *Coris julis* handelt es sich um einen bis zu 20cm großen Fisch, der im Litoral auf felsigen Untergründen in der Nähe von Seegraswiesen lebt. Teilweise lebt er solitär in einer Tiefe von 1 bis 60m, meist befinden sich aber mehrere Vertreter seiner Art am gleichen Ort. Er ernährt sich von benthischen Tieren wie Gastropoden, Seeigeln, Garnelen, Würmern, Isopoden und Amphipoden. Sein Verbreitungsgebiet liegt im östlichen Atlantik und im Mittelmeer. Aufgrund seiner Färbung wird der Meerjunker in Aquarien als Zierfisch verwendet.

Der Meerjunker wurde ausgewählt, da er im Küstengebiet Elbas sehr häufig aufzufinden ist und sich sehr neugierig und zutraulich zeigt. So wurde bei Unterwasserarbeiten beobachtet, daß er an dem in der Hand des Tauchers befindlichen Probenmaterial pickte.

Tripterygion tripteronotus (Spitzkopfschleimfisch)

T. tripteronotus wird bis zu 8cm groß. Sein Lebensraum ist das obere bewachsene Felslitoral direkt unter der Wasseroberfläche bis in eine Tiefe von 6m. Die Männchen sind sehr territorial und verteidigen ein Revier von ca. 2m Durchmesser.

Spitzkopfschleimfische ernähren sich vorrangig von kleinen bodenlebenden Crustaceen, aber auch von anderen benthischen Tieren und Algen. Sie sind im Mittelmeer und im Schwarzen Meer verbreitet und dort sehr häufig.

Die Spitzkopfschleimfische wurden wegen ihres häufigen Vorkommens im Flachwasser gewählt, da sie hier beim Schnorcheln leicht gefangen werden können.

Paracentrotus lividus (Steinseeigel)

Der Seeigel *P. lividus* lebt auf algenbewachsenen Felswänden in direkter Nachbarschaft zu den Schwämmen, häufig aber auch auf Seegraswiesen. Sein Verbreitungsraum ist das Mittelmeer und der Atlantik in einer Tiefe von 0 bis 30m. Er ernährt sich vorrangig von Algen, wobei seine bevorzugte Nahrung Braunalgen der Gattung *Cystoseira* sind. Bei Nahrungsmangel wird er zum Allesfresser.

P. lividus wurde aufgrund der erfolgreichen Fütterungsversuche, die Uriz et al. (1996) in Spanien durchgeführt hatten, ausgewählt.

Blennius sphinx (Sphinx-Schleimfisch)

Blenniiden sind kleine, bodenlebende Fische, die bevorzugt im Gezeitenbereich felsiger Küsten leben. Sie gehören der Ordnung der *Perciformes*, der Barschartigen, an. Der deutsche Gattungsname Schleimfische weist auf die schleimige Beschaffenheit ihrer Haut hin, die je nach Art kleine Rund- oder Kammschuppen enthält oder nackt ist. Charakteristisch sind die kehlständigen Bauchflossen, die aus nur zwei bis fünf Weichstrahlen bestehen. After- und Rückenflosse sind lang und reichen oft bis zum Schwanz. Viele Arten besitzen fächer- oder geweihförmige Anhänge am Kopf.

Bevorzugter Lebensraum der Spezies *Blennius sphinx* ist die Oberfläche von Felsen, die nur wenig unter der Wasseroberfläche liegen. Häufig bleiben sie bei Ebbe in wassergefüllten Tümpeln und Spalten zwischen Algen zurück. Mit den schmalen Bauchflossen und den großen kehlständigen Brustflossen sind sie in der Lage, sich auch bei starkem Seegang auf den glatten Oberflächen der Felsen festzuhalten.

Die bis zu 6cm großen Fische nutzen Schlupfwinkel im Fels, die sie zur Ruhe, als Versteck und als Laichplatz aufsuchen. Die Männchen sind stark revierbildend und ortstreu. Während der Laichzeit zwischen Mai und Juli bewachen sie die wenigen Eier, die die Weibchen in die Schlupflöcher ablegen. Rivalen werden durch Drohen mit aufgestellten Rückenflossen und wippenden Kopfbewegungen vertrieben.

Sphinxschleimfische fressen kleine Invertebraten, bevorzugt *Crustaceen*, und Algen.

Der Verbreitungsraum von *B. sphinx* erstreckt sich vom Schwarzen Meer über das Mittelmeer bis hin zur Atlantikküste Marokkos.



Abb.2.1.: Die Fische *Triterygion tripteronotus* (links) und *Blennius sphinx* (rechts)

2.2.2.3. Fangorte- und methode

Coris julis wurde in der Bucht von Fetovaia tauchend in einer Tiefe von 5 bis 10m mit Keschern gefangen. Auch die Seeigel entstammen dieser Bucht und wurden in einer Tiefe von bis zu 5m von den Felsen abgesammelt.

Die Fische der Spezies *Blennius sphinx* und *Triptygion tripteronotus* wurden schnorchelnd in einer Tiefe von bis zu 50cm mit kleinen Keschern gefangen. Fangorte waren ein Bootsslip am Strand der Ortschaft Patresi im Westen Elbas und verschiedene überflutete Felsplateaus am Strand von Seccetto im Süden der Insel.

Zurück an der Station wurden die Tiere bestimmt und in belüftete, meerwassergefüllte Plastikwannen gegeben.

2.2.2.4. Der Transport und die Haltung der Fische

Für die Durchführung der Fütterungsversuche am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf mußten die Fische der Spezies *Blennius sphinx* nach Deutschland transportiert werden. Dort wurden sie in einem Aquarium gehalten.

Der Transport der Fische erfolgte in mit Seewasser gefüllten und mit reinem Sauerstoff begasten Plastikbeuteln. Diese wurden für die Dauer des Transportes in Styroporboxen mit handelsüblichen Kühlelementen gekühlt.

Für die Fütterungsversuche wurden zwischen 60 und 80 Fische in einem Aquarium der Größe BxHxT = 175 x 40 x 85cm gehalten. Das Seewasser war teils aus dem Mittelmeer mitgebracht worden, teils wurde es durch Mischung von Meersalz mit vollentsalztem Wasser hergestellt. Es wurde ständig mit einem Aquariumfilter gereinigt und durch eine leistungsstarke Pumpe ausreichend belüftet. Der Salzgehalt wurde in regelmäßigen Abständen mit einem Salimeter überprüft und bei Bedarf mit vollentsalztem Wasser, bzw. Meersalz neu eingestellt. Darüber hinaus wurden pro Monat etwa zehn bis zwanzig Prozent des Aquariumwassers erneuert.

Regelmäßig wurde dem Wasser außerdem die Bakterienkultur „Cycle Biologischer Aquariumzusatz“ hinzugefügt, um den Abbau von Ammoniak und Nitrit zu begünstigen.

Um die Felsnischen der natürlichen Umgebung der Fische nachzustellen und den Versuchsfischen damit eine Behausung und die Möglichkeit zum Versteck zu bieten, wurden im hinteren Drittel des Aquariums durchbohrte Ziegelsteine aufgestellt.

An Tagen, an denen keine Experimente durchgeführt wurden, wurden die Fische mit TetraMarin Granulat gefüttert.

DER CHEMISCHE FRASSSCHUTZ DER MITTELMEER-SCHWÄMME

2.3. Die Extraktion der Schwämme

Zur Extraktion des gesammelten Schwammmaterials wurden zunächst die in Ethanol konservierten Proben aufgetaut und das Ethanol/Wassergemisch über einen Papierfilter abgegossen. Filtrerrückstand und Schwammmaterial wurden vereinigt und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingengt, bis das Konservierungsmittel vollständig verdampft war. Sowohl die Schwammprobe als auch der wässrige Extrakt (Extrakt 1) wurden bei – 80°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Die trockene Schwammprobe wurde nun in einem Labormixer zerkleinert und anschließend nach dem Extraktionsschema in Abbildung 2.2. dreimal mit Methanol und einmal mit Dichlormethan extrahiert.

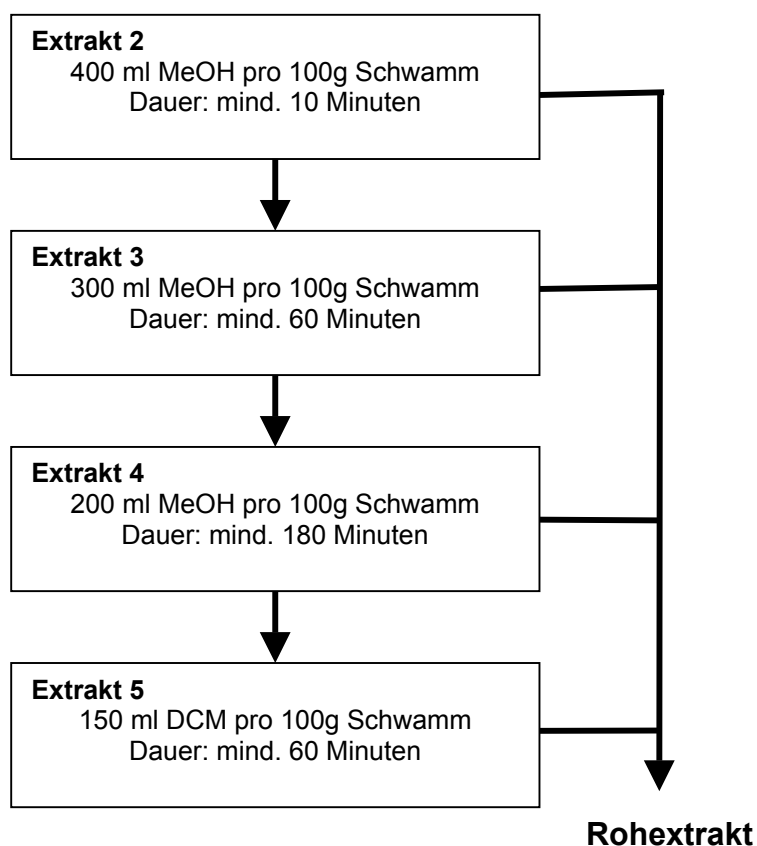


Abb.2.2.: Extraktionsschema der MeOH/DCM-Extraktion

Nach jedem Extraktionsschritt wurde das Lösungsmittel über einen Papierfilter abdekantiert. Anschließend wurden die Extrakte vereinigt. Extrakt 1 (Ethanol/Wasserextrakt) wurde in Methanol angelöst, über einen Papierfilter gegeben und ebenfalls zu den anderen Extrakten gegeben. Der so entstandene Rohextrakt wurde dann mit dem Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt, im Vakuumexsikkator getrocknet und anschließend gewogen. Nun konnte das Extraktgewicht pro Volumen Schwammprobe errechnet werden.

Um einen Eindruck von der Komplexität ihrer Zusammensetzung zu bekommen, wurde eine jeweils kleine Menge der Rohextrakte in der HPLC analysiert. Die Vorgehensweise entsprach dabei der in 2.7.1. beschriebenen Methode.

2.4. Die Durchführung der Fütterungsversuche mit den Rohextrakten

Grundlage der ursprünglich von Schupp et al. (1999) entwickelten Fütterungsversuche ist die gleichzeitige Präsentation eines mit Schwammextrakt behandelten Futterstückes und einer unbehandelten Kontrolle. Zeigen die Fische im Verlauf des Experimentes eine deutliche Präferenz für das Kontrollfutter, so wird daraus abgeleitet, daß die in das Futterstück eingearbeiteten Schwammetaboliten fraßhemmend auf die Versuchsfische wirken.

In meiner Arbeit sollte ermittelt werden, welche Schwämme in der Lage sind, sich in ihrem natürlichen Lebensraum mit Hilfe ihrer Sekundärmetaboliten gegen potentielle Predatoren zu wehren. Deshalb mußten die Extrakte in ihrer natürlichen Konzentration im Schwammgewebe in die Futterstücke eingearbeitet werden. Hierzu wurde berechnet, welche Anteile der erhaltenen Extrakte aus jeweils 10ml Schwammgewebe stammen. Die Zusammensetzung des Futterstückes, in das diese Menge an Extrakt eingearbeitet wurde, wurde dann so gewählt, daß sein Endvolumen nach Herstellung ebenfalls 10ml betrug. Das präparierte Futterstück hatte so den gleichen Gehalt an Sekundärmetaboliten, wie ein Schwammstück der gleichen Größe.

2.4.1. Die Herstellung des Futters

Der gesamte aus einer Schwammart gewonnene Extrakt wurde in einer definierten Menge Lösungsmittel angelöst. Der Anteil, der die benötigte Extraktmenge für ein 10ml-Futterstück enthielt, wurde berechnet.

Dann wurde 1,053g des Fischfuttergranulates mit einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen und in einen Rundkolben gegeben. Das berechnete Volumen an Extraktlösung wurde mit einer Meßpipette aufgenommen und ebenfalls in den Kolben gegeben. Fischfutter und gelöster Extrakt wurden gründlich gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Schwammetaboliten zu gewährleisten. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer vollständig verdampft. Mit Hilfe eines Spatels, wurde anschließend das zurückgebliebene Fischfutter/Extrakt-Gemisch vom Kolbenboden abgelöst.

0,189g Agar wurden in einen kleinen Erlenmayerkolben zu 9,5ml vollentsalztem Wasser gegeben. Der Kolben wurde mit Alufolie verschlossen und für die Dauer von vier Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Anschließend wurde der Agar, nachdem er auf eine Temperatur von 55°C abgekühlt war, zum Fischfutter/Extrakt-Gemisch in den Kolben gegeben und gründlich verrührt.

Für die Herstellung der Kontrolle wurde nach dem gleichen Schema verfahren. Hierbei wurde aber, statt des in Lösungsmittel gelösten Extrakts, reines Lösungsmittel mit dem zermahlenen Fischfuttergranulat vermischt.

Beide Gemische wurden anschließend in eine Gußform aus Plexiglas gegeben. Die Gußform besaß zwei längliche Öffnungen der Größe 2,5 x 25cm. Unter die Form wurden ein Fliegengitter und eine Wachsfolie gelegt. Eine der beiden Öffnungen wurde nun mit der Kontrolle befüllt, die andere mit dem mit Extrakt behandelten Fischfutter/Agar-Gemisch. Ein Plexiglasschieber diente dazu, das Futter in einer exakten Höhe von 2mm in der Gußform zu verteilen.

Nachdem der Agar abgekühlt war und abgebunden hatte, konnte die Gußform entfernt werden. Die zwei Futterstücke blieben auf dem Fliegengitter zurück, welches dann in sechs Streifen mit einer Breite von je zehn Fliegengitterquadraten zerschnitten wurde. Damit wurden sechs Futterstreifen mit je zwei Futterstücken erhalten wovon eines mit

Extrakt behandelt und das andere, die Kontrolle, unbehandelt war. Beide Futterstücke bedeckten eine Fläche von 10 x 15 Fliegengitterquadraten und hatten eine Höhe von 2mm.

An die Futterstreifen wurden mit Sicherheitsnadeln Metallscheiben angeheftet, um zu gewährleisten, daß die Futterstücke nicht vom Boden des Aquariums abgehoben werden. An die Seite des mit Extrakt behandelten Futterstücks wurde zur Markierung eine zusätzliche Sicherheitsnadel angesteckt.



Abb.2.3.: Die Futterstreifen vor und nach dem Experiment

2.4.2. Der Ablauf und die Auswertung der Fütterungsversuche

Sechs Futterstreifen wurden gleichzeitig in das Aquarium gegeben. Sie wurden gleichmäßig über den vorderen Bereich des Beckens verteilt, wobei die Lage von Kontrolle und behandeltem Futterstück von Futterstreifen zu Futterstreifen variiert wurde.

Der Versuchsverlauf wurde in regelmäßigen Abständen beobachtet. Sobald von einem Futterstreifen mindestens ein Drittel der gesamten darauf befindlichen Futtermenge abgefressen worden war, wurde dieser aus dem Becken entnommen und der Zeitpunkt der Entnahme notiert. Anschließend wurden die durch das Abfressen des Futters freigewordenen Kästchen unter dem behandelten Futterstück und der Kontrolle gezählt. Die Summe aus beiden Futtermengen wurde gebildet und ergab die Gesamtfuttermenge, die pro Futterstreifen abgefressen worden war.

Anhand des Anteils des gefressenen Kontrollfutters am gesamten gefressenen Futter eines Futterstreifens wurden Rückschlüsse auf die Intensität der Fraßhemmung eines Extraktes gezogen: Besitzt ein Extrakt keine oder geringe fraßhemmende Wirkung, so sind beide Futterstücke auf einem Futterstreifen für die Fische mehr oder weniger gleichwertig. Die Fische fressen deshalb ungefähr gleich viel vom behandelten Futterstück wie von der Kontrolle. Der Anteil der von der Kontrolle abgefressenen Futtermenge an der gesamten gefressenen Futtermenge liegt damit bei etwa 50%. In gewissem Rahmen können Schwankungen um diesen Wert durch zufällige Verhaltensweisen der Fische erklärt werden.

Bei starker Fraßhemmung des Extraktes im behandelten Futterstück wird hingegen deutlich die Kontrolle bevorzugt. Der prozentuale Anteil der abgefressenen Kontrollfuttermenge an der Gesamtfuttermenge steigt also mit der Intensität der fraßhemmenden Wirkung des eingearbeiteten Extraktes. Dieser Anteil kann somit als Maßzahl für die Intensität der Fraßhemmung, die vom jeweiligen Extrakt ausgeht, verwendet werden.

Jeder Extrakt wurde in zwei Versuchsdurchgängen auf je sechs Futterstreifen gegen Kontrollen getestet. Mit Hilfe eines t-Tests für verbundene Stichproben wurde bestimmt, ob sich die Mittelwerte der Futtermengen, die von Kontrolle und behandeltem Futterstück abgefressen worden waren, signifikant unterscheiden.

Pro Tag wurde maximal ein Fütterungsversuch durchgeführt.

2.5. Die Nährstoffanalyse

Für heterotrophe Organismen steigt die Attraktivität der Nahrung mit ihrem Nährstoffgehalt. Je höher der Nährwert der gefressenen Beute ist, umso geringer ist der Aufwand, der aufgebracht werden muß, um den Tagesbedarf an lebensnotwendigen Substanzen zu decken. Der Überschuß an Energie kann in Wachstum und Fortpflanzung investiert werden. Der Räuber kann sich also durch die Wahl nährstoffreicher Beute einen Vorteil gegenüber seinen Konkurrenten verschaffen. Anders ist die Situation für den Beuteorganismus. Mit dem Nährstoffgehalt seines Gewebes steigt auch der Fraßdruck, der auf ihn wirkt. Um dennoch überleben zu

können, muß er Mechanismen entwickeln, die seine Attraktivität als Beute verringern. Hierzu könnte ihm ein chemischer Fraßschutz dienen.

Aufgrund dieser Überlegungen sollte überprüft werden, ob bei den untersuchten Schwämmen ein Zusammenhang zwischen dem Gewebenährstoffgehalt und der Wirksamkeit ihrer Sekundärmetaboliten als Fraßschutz erkennbar ist. Gefriergetrocknete Schwammstücke wurden hierzu an die Arbeitsgruppe Kaiser am Botanischen Institut der Universität Würzburg gesendet. Mit Hilfe der Plasmaemissionsspektroskopie (ICP – Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy) wurden hier die Gehalte an Stickstoff und Kohlenstoff in den Schwammproben ermittelt. Um die Proben in das Spektroskop einbringen zu können, mußten die Schwammstücke zunächst gefriergetrocknet und je nach Beschaffenheit mit Hilfe eines Mörsers oder eines Labormixers zu einem feinen Pulver zermahlen werden. Proben, bei denen aufgrund ihrer Faserigkeit nach dem Zermahlen noch große Stücke im Pulver zurückgeblieben waren, wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kaiser zusätzlich in einer Schwingmühle homogenisiert. Anschließend wurden die Proben in einem Emissionsspektroskop des Herstellers Jobin Yvon/HORIBA Ltd. analysiert. Die Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte wurden in Prozent der Gesamtprobe angegeben. Es wurden jeweils drei Parallelen gemessen.

Das Vorhandensein eines linearen Zusammenhangs zwischen dem Nährstoffgehalt der Schwämme und dem Ausmaß ihres chemischen Fraßschutzes wurde mit dem t-Test zur Prüfung des Maßkorrelationskoeffizienten (Köhler et al. 1985) auf einem Signifikanzniveau von 5% überprüft.

Ergänzend zur Nährstoffmessung in den Schwammproben wurde das Futtergranulat, das zur Herstellung des Versuchsfutters verwendet worden war, analysiert. Durch Vergleich des gemessenen Nährstoffgehaltes des Futtergranulats mit den Gehalten in den Schwammgeweben sollte abgeschätzt werden, inwieweit die Ergebnisse des Fütterungsversuchs durch das verwendete Versuchsfutter beeinflusst worden waren.

DIE FRASSSCHUTZMETABOLITEN DES SCHWAMMES *APLYSINA CAVERNICOLA*

Durch eine Vielzahl von Studien existiert bereits ein umfangreiches Wissen über die Sekundärmetaboliten von Aplysinidae-Schwämmen (siehe 1.5.). Die Enzymreaktion, die induziert durch Verletzung des Gewebes in den Zellen dieser Schwämme stattfindet, wurde in verschiedenen Arbeiten eingehend charakterisiert. Auch über die Bioaktivität der Substrate und Produkte dieser Reaktion gegenüber Mikroorganismen und potentiellen Epibionten ist vieles bekannt. Doch das Bild, das man von den Substraten und Produkten der Enzymreaktion hinsichtlich ihrer Funktion als Fraßschutz gegen Fische als potentielle Predatoren hat, ist noch weitgehend unvollständig. Deshalb wurde *Aplysina cavernicola*, ein Vertreter der Familie der Aplysinidae für weitergehende Untersuchungen zum molekularen Ursprung des Fraßschutzes ausgewählt.

2.6. Methoden zur Fraktionierung des Rohextraktes

2.6.1. Das Ausschütteln mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität

Das Ausschütteln eines Substanzgemisches dient der Trennung der Komponenten in Fraktionen unterschiedlicher Polarität. Die Substanzen werden in einem Schütteltrichter mit einem lipophileren und einem hydrophileren Lösungsmittel versetzt. Durch kräftiges Schütteln bildet sich eine Suspension der beiden Lösungsmittel, wobei sich die polarerer Komponenten des Substanzgemisches in den Tröpfchen des hydrophileren Solventen lösen, während die unpolarerer im lipophileren Lösungsmittel gelöst werden. Läßt man das Gemisch über eine gewisse Zeit stehen, so trennen sich die beiden Lösungsmittel und es bildet sich im Idealfall eine deutliche Phasengrenze aus. Nun können die Solventen nacheinander dem Schütteltrichter entnommen werden. Die darin gelösten Komponenten des Substanzgemisches befinden sich nun in Fraktionen unterschiedlicher Polarität.

2.6.2. Chromatographische Methoden

Unter dem Begriff Chromatographie faßt man physikalische Trennmethode zusammen, die eine Auftrennung von Stoffgemischen durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Komponenten im Gemisch mit einer stationären Phase und dem Fließmittel ermöglichen.

2.6.2.1. Die Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente einerseits der Ermittlung von geeigneten Fließmittelgemischen für die säulenchromatographischen Trennverfahren, andererseits wurde sie dazu verwendet, die Zusammensetzung säulenchromatographisch getrennter Fraktionen zu ermitteln.

Diese Methode besitzt den Vorteil, daß mehrere Proben rasch nebeneinander analysiert werden können und ermöglicht so einen schnellen Überblick über die Zusammensetzung der großen Zahl an Fraktionen, die aus einer säulenchromatographischen Trennung resultieren. Anhand dieser Analyse ist es dann möglich, Fraktionen mit ähnlicher Stoffzusammensetzung zusammenzufassen, um eine weitere Bearbeitung und Analyse, beispielsweise mittels HPLC, zu vereinfachen.

Verwendet wurden hierfür DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F₂₅₄ (Alufolie, 0,2mm Schichtdicke). Das Fließmittel wurde in Abhängigkeit von den Eigenschaften der zu untersuchenden Proben und der stationären Phase gewählt und in die DC-Kammern gegeben, so daß ein Flüssigkeitsstand von ca. 1cm erreicht wurde. Nach anschließender 30minütiger Kammersättigung wurden die DC-Platten, auf die im unteren Bereich kleine Mengen der zu analysierenden Proben aufgetragen worden waren, in die DC-Kammern gestellt und über eine Strecke von 7cm entwickelt. Nach Trocknung konnten nun die auf der DC-Platte getrennten Komponenten mit einer UV-Lampe bei 254 (Fluoreszenzlöschung) und 366nm (Eigenfluoreszenz) sichtbar gemacht werden. Zusätzlich diente das Besprühen der Platten mit Anisaldehyd-Schwefelsäurereagens und das Erhitzen auf 110°C für 3min. dem Sichtbarmachen weiterer Inhaltsstoffe.

2.6.2.2. Die Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie dient der präparativen chromatographischen Trennung von Substanzgemischen an in Röhren gepackten stationären Phasen. Das zu trennende Gemisch wird als konzentrierte Lösung in dem gewählten Fließmittel auf den Säulenkopf aufgetragen und wandert dann, angetrieben durch die Schwerkraft oder durch einen durch Pumpen erzeugten Druck durch das Säulenmaterial. Bedingt durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Komponenten in der Probe treten sie verschieden stark mit der stationären Phase in Wechselwirkung und verlassen daher zu unterschiedlichen Zeiten die Säule. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers können deshalb die einzelnen Fraktionen zeitlich getrennt nacheinander in Reagenzgläsern gesammelt werden.

Größenausschluß-Chromatographie

Bei der Größenausschlußchromatographie, auch Gel-Permeations-Chromatographie genannt, erfolgt die Trennung von Substanzen nach der Molekülgröße. Als stationäre Phase der Trennsäule dienen Gele, deren Bestandteile eine definierte Porenstruktur besitzen. Für meine Untersuchungen wurde hierzu das Gel Sephadex LH-20 verwendet. Je kleiner die Probenmoleküle sind, umso tiefer können sie in die poröse Matrix der stationären Phase eindringen. Solange sich die Partikel in den Poren befinden, werden sie nicht vom Lösungsmittelstrom weitertransportiert. Damit wandern kleinere Moleküle langsamer durch die Säule als große. Beim Säulenmaterial Sephadex LH-20 spielen für die Trennung zusätzlich zu diesem Größenausschlußeffekt auch Adsorptionseffekte eine Rolle.

Normalphasen-Chromatographie

Bei der Normalphasen-, oder auch klassischen Säulenchromatographie, werden relativ grobkörnige stationäre Phasen, für meine Untersuchungen Kieselgel, mit einer Korngröße zwischen 40 und 63µm eingesetzt. Hier treten die Komponenten in Abhängigkeit von der Polarität ihrer Seitengruppen in unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial und werden dadurch mit verschiedenen Geschwindigkeiten vom Lösungsmittelstrom durch die Säule transportiert.

2.7. Methoden zur Identifizierung der Extraktkomponenten und zur Reinheitsprüfung

2.7.1. Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC = high performance liquid chromatography) diente in meiner Arbeit zur analytischen Bestimmung der Komponentenzusammensetzung in Fraktionen, zur Identifizierung von einzelnen Metaboliten und zur Reinheitsbestimmung von isolierten Substanzen. Darüber hinaus wurde sie zur Quantifizierung von Sekundärmetaboliten im Schwammgewebe verwendet.

Auch bei der HPLC handelt es sich um eine säulenchromatographische Methode. Sie besitzt durch eine sehr kleine Korngröße der stationären Phase eine besonders hohe Trennleistung. Das Elutionsmittel wird mit Hilfe von Pumpen unter hohem Druck durch die Säule gepreßt. Um auch bei geringen Unterschieden der untersuchten Substanzen hinsichtlich ihres Molekulargewichts, ihrer Löslichkeit und ihrer Polarität eine klare Trennung der Komponenten zu erhalten, bedient man sich einer Gradientenelution. Hierbei wird der Gradient zwischen den Komponenten des Fließmittels kontinuierlich verschoben, so daß die Komponenten der Probe ihrer Polarität entsprechend nacheinander angelöst werden.

Für meine Untersuchungen wurde ein Fließmittelgemisch aus 0,15%iger Phosphorsäure und Methanol gewählt. Der Gradient verlief nach dem Schema in Abb.2.4.

Die Flußrate der Eluenten durch die in einem Säulenofen mit 20°C konstant temperierte Säule betrug 1ml pro Minute. Die Proben wurden in einem Volumen von 20µl injiziert (Abweichungen hiervon für die Ermittlung der Eichgeraden; siehe 2.10.1.).

Abhängig von den polaren Eigenschaften der Komponenten der Probe verlassen die verschiedenen Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten die Säule. Ein UV-Detektor am Säulenende mißt die Extinktion des UV-Lichts der ankommenden Metaboliten bei 210nm, 235nm, 254nm und 366nm. Diese ist zum einen vom Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Substanzen, zum anderen von ihrer Konzentration in der Probe

abhängig. Die Extinktion wird gegen die Verweildauer auf der Säule (Retentionszeit) aufgetragen. Darüber hinaus werden die UV-Spektren der Probenkomponenten aufgezeichnet. Die gemessene Retentionszeit bei einem definierten Gradienten und die UV-Spektren können dann mit Literaturdaten verglichen werden und so der Identifizierung der Substanzen in der Probe dienen.

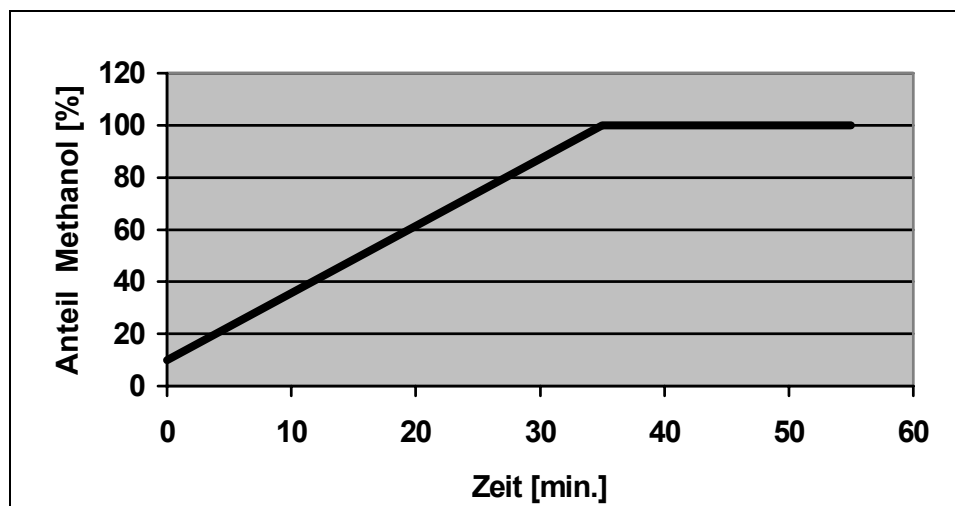


Abb.2.4.: Verlauf des Gradienten der analytischen HPLC-Analyse (Eluenten: 0,15%ige Phosphorsäure und HPLC-Methanol)

Vor der HPLC-Analyse wurden die Proben jeweils in HPLC-Methanol oder in einer Mischung aus HPLC-Methanol und Nanopur-Wasser angelöst und zentrifugiert. Für die quantitativen Inhaltstoffbestimmungen (siehe 2.10.) wurde bei Bedarf das nach Zentrifugation ausgefallene Material im Ultraschallbad erneut angelöst und nochmals zentrifugiert.

2.7.2. Die NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Spektroskopie

Zur Prüfung der Reinheit des Pigmentes wurden zusätzlich zur HPLC-Analyse NMR-Spektren dieser Substanz aufgenommen. Die NMR-Spektroskopie wurde am Institut für Organische Chemie an der Universität Düsseldorf mit einem Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 500MHz. Als Lösungsmittel für die Probe diente deuteriertes Methanol.

2.8. Die Fraktionierung des Extraktes

Das Schema der Fraktionierung ist in Abb.2.5. graphisch dargestellt.

Im ersten Fraktionierungsschritt wurde der Rohextrakt aus 305ml ethanolkonserviertem Schwammgewebe (Extraktgewicht = 16,63969g) in 450ml Ethylacetat und 450ml Wasser gelöst und anschließend in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nachdem die Phasen getrennt worden, wurde die Wasserphase noch elf mal gegen je 450ml Ethylacetat ausgeschüttelt.

Alle auf diese Weise erhaltenen Ethylacetatfraktionen wurden vereinigt und mit dem Rotationsverdampfer auf ein definiertes Volumen von 2l eingeengt. Ein Aliquot von 65,6ml für den Fütterungsversuch und 5ml für eine Messung mit der HPLC wurden entnommen. Dann wurde das Ethylacetat vollständig verdampft.

Um neben dem qualitativen auch einen quantitativen Vergleich zwischen den beiden Phasen zu ermöglichen, wurde aus der Wasserphase der gleiche Anteil des Extraktes entnommen und mittels HPLC analysiert. Hierzu wurde der im Wasser gelöste Extrakt auf 1l aufgefüllt und es wurden 2,5ml HPLC-Probe entnommen. Nachdem die Aliquots für zwei Fütterungsversuche (2x 32,8ml) entnommen worden waren, wurde der Extrakt gefriergetrocknet.

Um die Hauptkomponente der Wasserphase aufzureinigen, wurde anschließend zweimal eine Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt.

Der erste Reinigungsschritt fand mit einer Sephadex-Säule (Innendurchmesser: 45mm; Höhe des Gelbettes: ca.80cm; Fließmittel: Methanol) statt. Anhand der DC-Analyse (Fließmittel DCM:MeOH = 9:1 + 1% NH₃) wurden nach dieser Auftrennung sechs Fraktionen zusammengefaßt. Fraktion 2 und 6 ließen nach Messung mit der HPLC auf eine reine Substanz schließen, die anhand ihres UV-Spektrums als das Pigment des Schwammes identifiziert wurde. Ein starker Geruch dieser Fraktionen ließ aber dennoch eine nicht detektierte Verunreinigung durch Amine vermuten. Aus diesem Grund wurde eine weitere Reinigung von Fraktion 2 mit einer längeren Sephadex-Säule (Innendurchmesser: 29mm; Höhe des Gelbettes: ca.95cm; Fließmittel: Methanol) durchgeführt. Nach DC-Analyse (Fließmittel DCM:MeOH = 9:1 + 1% NH₃) wurden sieben Fraktionen erhalten, von denen die Fraktionen 3 bis 6 im HPLC-Chromatogramm die gewünschte Reinheit aufwiesen.

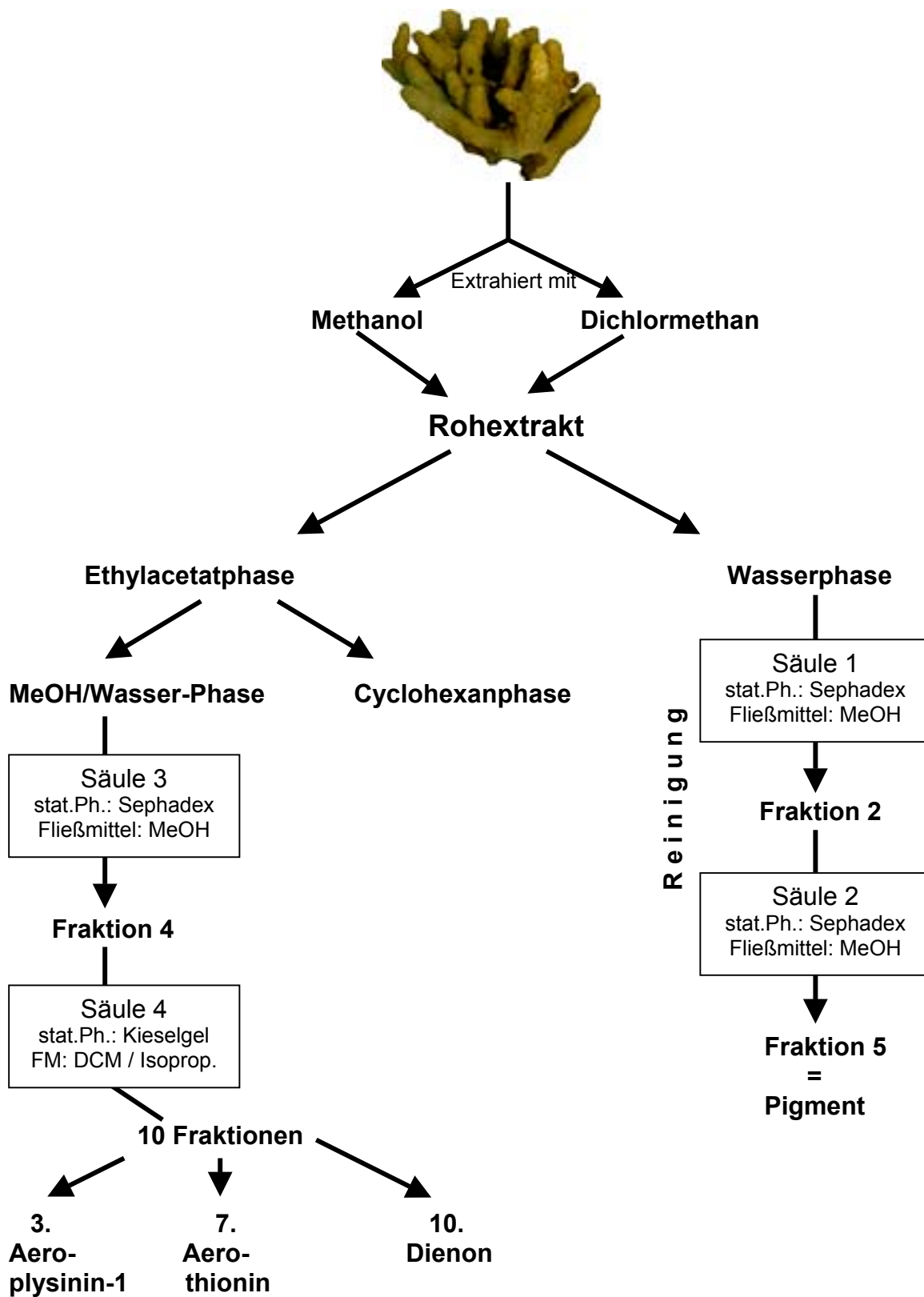
Um mit den vorhandenen Methoden die Fraktion mit der höchsten Reinheit bestimmen zu können, wurde jeweils ein bestimmter Anteil am Probengewicht in der HPLC analysiert und die zugehörige Extinktion ermittelt. Die Fraktion mit dem größten Verhältnis Extinktion / Probengewicht also mit der höchsten Konzentration des Pigmentes (Fraktion 5), wurde daraufhin für die Quantifizierung und die Fütterungsversuche ausgewählt. Nachträglich wurde die Reinheit des isolierten Pigmentes durch NMR-Spektroskopie bestätigt.

Das HPLC-Chromatogramm der Ethylacetatphase wies deutlich mehr Komponenten auf als das der Wasserphase. Aus der Ethylacetatphase mußten deshalb zunächst die stark lipophilen Substanzen entfernt werden, um weitere Trennungsschritte zu ermöglichen. Hierzu wurde der Extrakt in 300ml Cyclohexan, 270ml Methanol und 30ml Wasser angelöst und ausgeschüttelt. Die Methanol/Wasser-Phase wurde noch dreimal mit je 300ml Cyclohexan gereinigt. Alle Cyclohexanphasen wurden vereinigt, auf 1000ml aufgefüllt und es wurden Aliquots für ein Fütterungsexperiment und die HPLC-Analyse entnommen.

Die Methanol/Wasserphase wurde mit einem Rotationsverdampfer eingeeengt und mit Methanol auf ein exaktes Volumen von 250ml aufgefüllt, um die Aliquots für den Fütterungsversuch und die HPLC-Analyse entnehmen zu können. Dann wurde das Methanol aus der Fraktion mit dem Rotationsverdampfer entfernt und der zurückgebliebene Schwammextrakt gefriergetrocknet.

Für die weitere Auftrennung des Substanzgemisches wurde der Extrakt wieder in einer geringen Menge Methanol angelöst und auf eine Sephadex-Säule gegeben (Innendurchmesser: 29mm; Höhe des Gelbettes: ca. 60cm; Fließmittel: Methanol). Nach DC-Analyse (Fließmittel DCM:MeOH = 9:1) wurden fünf Fraktionen erhalten, die alle mittels HPLC analysiert und im Fütterungsversuch getestet wurden.

Fraktion 4 wurde anschließend mit Hilfe einer Kieselgelsäule weiter aufgetrennt (Innendurchmesser: 29mm; Höhe des Gelbettes: ca. 60cm; Fließmittel: DCM : Isopropanol = 93:7). Hier wurden nach DC-Analyse (Fließmittel DCM : Isopropanol = 93:7) zehn Fraktionen zusammengefaßt. Aus den HPLC-Chromatogrammen ließ sich erkennen, daß es sich bei den Fraktionen 3, 7 und 10 um Reinsubstanzen handelte, wobei Fraktion 3 anhand des UV-Spektrums als Aeroplysinin-1, Fraktion 7 als Aerothionin und Fraktion 10 als Dienon identifiziert wurden.

**Diagr.2.5:** Extraktions- und Fraktionierungsschema des Extraktes von *Aplysina cavernicola*

2.9. Die Fütterungsversuche mit den Fraktionen des Rohextraktes

Die für die Fraktionierung verwendete Extraktmenge von 16,63969g war aus 305ml des ethanolkonservierten Gewebes von *A.cavernicola* gewonnen worden. Sämtliche während der Bearbeitung entnommenen Extraktmengen wurden notiert. So konnte nach jedem Fraktionierungsschritt berechnet werden, aus welchem ursprünglichen Gewebevolumen der übrige Extrakt stammt. Die Fütterungsversuche mit den Fraktionen wurden entsprechend der in 2.4. beschriebenen Methode durchgeführt, wobei auch hier Extraktmengen eingesetzt wurden, die jeweils aus einem Volumen von 10ml Schwammgewebe extrahiert worden waren.

Die Fütterungsversuche dienten zur Entscheidung welche der erhaltenen Fraktionen weiter bearbeitet werden müssen, um letztendlich die für die Fraßhemmung verantwortlichen Reinsubstanzen zu isolieren.

2.10. Quantifizierung der Reinsubstanzen in den Rohextrakten

Es ist unvermeidbar, daß im Laufe der Fraktionierung während der verschiedenen Bearbeitungsschritte Extraktverluste auftreten. Wird die Extraktmenge, die in den Fütterungsversuchen eingesetzt wird, um die natürliche Konzentration im Schwamm nachzuahmen, wie in 2.9. beschrieben, rein rechnerisch bestimmt, kommt es aufgrund dieser Extraktverluste von Fraktionierungsschritt zu Fraktionierungsschritt zu einer immer stärker werdenden Unterschätzung der tatsächlichen Fraßhemmungsaktivität der Fraktionen. Als reines Entscheidungskriterium für die Auswahl von Fraktionen, in denen fraßhemmende Metaboliten zu erwarten sind, ist eine Methode, in der die eingesetzten Extraktmengen rechnerisch bestimmt werden, vollkommen ausreichend. Die Reinsubstanzen sollten jedoch in ihrer natürlichen Konzentration im Schwammgewebe in die Futterstücke eingearbeitet werden. Nur so waren ein Vergleich zwischen ihren Fraßhemmungsaktivitäten und Aussagen über ihren tatsächlichen ökologischen Nutzen für den Schwamm möglich. Aus diesem Grund wurden die Reinsubstanzen vor ihrer Verwendung in den Fütterungsversuchen mit Hilfe der HPLC im Rohextrakt von *A.cavernicola* quantifiziert.

2.10.1 Die Ermittlung der Eichgeraden

Für die Quantifizierung mußten zunächst Eichgeraden für die jeweiligen Reinsubstanzen ermittelt werden, um dann die im Rohextrakt enthaltene Substanzmenge aus dem HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes ablesen zu können.

Hierzu wurden die erhaltenen Reinsubstanzen in jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen in die HPLC injiziert. Die Flächen unter den Extinktionspeaks, die sich für die jeweiligen Konzentrationen ergaben, wurden mit Hilfe der HPLC-Software integriert. Durch eine lineare Regression konnten dann, nach Auftragung der ermittelten Integrale gegen die eingesetzten Konzentrationen die Gleichungen der Eichgeraden bestimmt werden.

2.10.2. Die Bestimmung der Metabolitenkonzentration im Schwammgewebe

Der größte Teil des Schwammes *A.cavernicola* war in Ethanol konserviert worden. Ein definierter Teil des Extraktes dieses Gewebes wurde in der HPLC analysiert. Die Integrale der Extinktionspeaks der darin enthaltenen Komponenten wurden mit Hilfe der HPLC-Software errechnet. Anhand der Gleichungen der ermittelten Eichgeraden konnten nun die Gehalte der zu untersuchenden Reinsubstanzen im Rohextrakt bestimmt werden. Da der zur Quantifizierung eingesetzte Rohextrakt des ethanolkonservierten Schwammmaterials (im Folgenden Extrakt 2 genannt) aus einem bekannten Volumen an Schwammgewebe gewonnen worden war, waren hiermit direkt Aussagen über den Anteil der Metaboliten am gesamten Schwammgewebe möglich. Entsprechend konnten die Substanzen in die Futterstücke eingearbeitet werden.

Desweiteren wurden die Metabolitenkonzentrationen in einem Extrakt ermittelt, der aus einem zur Konservierung eingefrorenen und anschließend gefriergetrockneten Gewebestück von *A.cavernicola* erhalten worden war (im Folgenden Extrakt 1 genannt). Da diese Probe ursprünglich nicht zur quantitativen, sondern nur zur qualitativen Bestimmung der Komponentenzusammensetzung verwendet werden sollte, war das Volumen des frischen Schwammgewebes in diesem Fall nicht bestimmt worden. Für die Verwendung der in diesem Schwammstück gefundenen Extraktkomponenten im

Fütterungsexperiment waren quantitative Aussagen über deren Gehalt im Schwamm aber unerlässlich. Deshalb mußte das ursprüngliche Volumen des Gewebsstückes, das zur Gewinnung von Extrakt 1 extrahiert worden war, nachträglich berechnet werden. Das Gewicht des aus einem bekannten Volumen des ethanolkonservierten Schwammes gewonnenen Extraktes (Extrakt 2) diente hierbei als Anhaltspunkt. Das Verhältnis von erhaltenem Extraktgewicht pro Volumen extrahierten Schwammgewebes wurde für Extrakt 2 bestimmt. Das Gewicht von Extrakt 1 wurde durch diesen Wert dividiert und so das ursprüngliche Schwammvolumen, aus dem er extrahiert worden war, erhalten.

2.11. Die Fütterungsversuche mit den Reinsubstanzen

Nachdem die Reinsubstanzen in den Rohextrakten von *A.cavernicola* quantifiziert worden waren, wurden sie entsprechend ihrer ermittelten Konzentrationen in den unterschiedlich konservierten Geweben des Schwammes in die Futterstücke eingearbeitet. Die Herstellung des Futters und die Durchführung der Fütterungsexperimente entsprach der in 2.4. beschriebenen Methode.

3. Ergebnisse

3.1. Die Auswahl der Versuchstiere

Vier verschiedene Meerestiere wurden in Vorversuchen auf ihre Tauglichkeit als Testobjekte für die in 2.4. beschriebenen Fütterungsversuche getestet. Es wurden ausschließlich Organismen verwendet, deren Lebensraum sich mit dem der untersuchten Schwämme überschneidet. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, Tiere mit einem großen Nahrungsspektrum, also Nahrungs-Generalisten, in den Versuchen zu verwenden. So sollte einerseits gewährleistet werden, daß die Versuchstiere als potentielle Fraßfeinde der Schwämme überhaupt in Frage kommen, andererseits sollte aber auch vermieden werden, daß sie aufgrund einer Spezialisierung auf einen oder mehrere der untersuchten Schwämme in der Lage sind, einen eventuell vorhandenen Fraßschutzmechanismus zu umgehen.

Es zeigte sich, daß *Coris julis* deutlich schwieriger als zunächst angenommen einzufangen war. Nachdem zwei Exemplare gefangen und ins Aquarium eingesetzt worden waren, stellte sich heraus, daß der Streß durch das Fangen und die unvermeidbaren Störungen, denen sie im Aquarium ausgesetzt waren, die Fische so sehr beeinträchtigten, daß sie nicht fraßen. Eine natürliche Reaktion des Meerjunkers auf Streß ist es, sich in den Sand des Untergrunds einzugraben. Um den Fischen diese Reaktion zu ermöglichen und den Streß dadurch zu mindern, wurde etwas Sand auf den Boden des Versuchsbeckens gegeben. Ab diesem Zeitpunkt hielten sie sich, bis sie nach einer Woche wieder im Meer ausgesetzt wurden, versteckt. In dieser Zeit hatten die Fische nichts von den in das Becken gegebenen Futterstücken gefressen.

Der Seeigel *Paracentrotus lividus* ernährt sich in seinem natürlichen Lebensraum von Braunalgen. Den Angaben von Uriz *et al.* (1996) zufolge wird er bei Nahrungsmangel aber zum Allesfresser. Tatsächlich zeigte sich, daß das angebotene Präparat aus Fischfutter und Agar nach einer Woche Aushungerungszeit von den Tieren angenommen wurde. Allerdings erwies sich die Auswertung der Futterstücke nach dem

Versuch als sehr schwierig. So ließ sich nicht feststellen, welcher Teil der Futterstücke tatsächlich abgefressen worden war, da durch Kontakt mit den Stacheln zusätzlich Teile des Futters vom Fliegengitter abgelöst worden waren. Außer dem Futter wurden zudem auch Teile des Fliegengittermaterials gefressen.

Die Futterstreifen wurden (vermutlich zur Tarnung) trotz der daran angehängten Metallgewichte vom Boden abgehoben und mit den Stacheln aufgespießt.

Für weitere Versuche mit den Seeigeln müßte deshalb die Methode deutlich abgewandelt werden. Es wäre notwendig, eine Darbietungsform zu entwickeln, in der das Futter ausschließlich durch Abfressen ablösbar ist. Zudem müßte genau ermittelt werden, ab welcher Aushungerungszeit die Seeigel beginnen, das angebotene Futter zu fressen, um die Futterstücke nicht zu lange im Versuchsbecken lassen zu müssen.

Die Spitzkopfschleimfische der Spezies *Tripterygion tripteronotus* wurden gemeinsam mit den Sphinx-Schleimfischen *Blennius sphinx* gefangen. Während eines Schnorchelganges konnten mit geringem Aufwand insgesamt bis zu 50 Tiere gefangen werden. In die Versuchswannen eingesetzt zeigte sich aber, daß trotz der ähnlichen Lebensweise und Nahrungsgewohnheiten der beiden Arten nur die Fische der Spezies *B.sphinx* die angebotene Nahrung annahmen. Aus diesem Grund wurde *T.tripteronotus* wieder ausgesetzt. *Blennius sphinx* hingegen erwies sich für die Versuche als sehr gut geeignet.

Aufgrund der geringen Größe der Schleimfische mußte eine relativ große Zahl an Tieren eingesetzt werden, damit in überschaubarer Zeit auswertbare Mengen an Futter gefressen wurden. Zunächst wurden die Parallelen in getrennten Wannen mit je zwanzig Fischen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die gewählten Versuchsfische sehr selektiv fraßen und mit Extrakt behandelte Futterstücke meist mieden.

Die Tiere fraßen immer sofort nachdem das Futter in die Versuchsbecken hineingegeben wurde. Eingriffe in die Becken, wie etwa beim Wechseln des Wassers, schienen die Fische nicht wesentlich zu beeinträchtigen. Auch die hohe Individuendichte während der Vorversuche verminderte die Freßbereitschaft nicht. Teilweise wurde Balz- und Konkurrenzverhalten beobachtet, dennoch waren alle Tiere in der Lage, von den angebotenen Futterstücken zu fressen.

Aufgrund der großen Zahl an Fütterungsversuchen, die durchzuführen waren, und um die Vorgehensweise der Fraktionierung des Rohextraktes von *Aplysina cavernicola* entsprechend der aus den Fütterungsversuchen gewonnenen Ergebnisse gestalten zu können, wurde beschlossen, die Durchführung der eigentlichen Experimente nach Düsseldorf zu verlagern.

3.2. Die gesammelten Schwämme

Die folgenden Beschreibungen der Schwämme entstammen im wesentlichen meinen eigenen Beobachtungen, und wurden nur teilweise mit Informationen die ich aus Rupert Riedl (1983) *Fauna und Flora des Mittelmeers* entnommen habe, abgeglichen. Es handelt sich damit um eine subjektive Darstellung, die dazu dienen soll, den Zustand und die Umgebung der Schwämme am Ort der Probenahme zum Zeitpunkt der Probenahme und meine Beobachtungen während der Bearbeitung zu veranschaulichen.

Aplysina cavernicola VACELET

-

Dieser Schwamm bildet bis zu 30cm hohe, schwefelgelbe Schlote aus und tritt meist in größeren Kolonien auf. Wie sich aus seinem Namen ableiten läßt, lebt er in geringeren Tiefen meist kryptisch. In größeren Tiefen ab 20m kommt er auch an exponierteren Stellen vor.

A.cavernicola besitzt keine Kalk- oder Kieselnadeln. Sein Skelett besteht aus einem Netz aus Sponginfasern, das ihn sehr elastisch macht. Anders als sein direkter Verwandter *Aplysina aerophoba* färbt er sich bei Luftkontakt nicht sofort schwarz. Unter Einfluß des Konservierungsmittels Ethanol ändert sich seine Färbung allerdings in ein dunkles violett. Der Extrakt besitzt hellgelbe Farbe und eine intensive blauviolette Fluoreszenz.

Die Proben für meine Untersuchungen wurden in einer Tiefe von etwa 40m am Capo di Fonza gesammelt.

Chondrosia reniformis NARDO

C. reniformis ist von massiger Gestalt. Größere Individuen sind häufig unregelmäßig verzweigt, während kleinere Schwämme die namensgebende Nierenform besitzen. Die Oberseite des Schwammes ist glatt und gelbbraun bis schwarzbraun gefärbt, die Unterseite ist deutlich heller.

Gerät der Schwamm in Kontakt mit Luft, so lässt sich oft eine Verdunklung des Oberflächenfarbtones beobachten und es macht sich ein starker Pyridingeruch bemerkbar.

Der Schwamm ist in Tiefen ab ca. 3m relativ häufig. Meist befindet er sich im Halbschatten an Felsenüberhängen.

C. reniformis besitzt kein Kieseleskelett. Er ist allerdings durch viele Kollagenfasern sehr zäh und lässt sich für die weitere Bearbeitung nur sehr schwer zerkleinern. Im Querschnitt des Schwammes lässt sich deutlich eine ca. 2mm dicke Außenschicht vom Mesohyl abgrenzen.

Die für die Extraktion verwendeten Individuen wurden in einer Tiefe von ungefähr 12m in der Bucht von Sant'Andrea gesammelt.

Ircinia spinosula SCHMIDT

Dieser Schwamm ist ebenfalls sehr massig, allerdings meist von eher kugelförmiger Gestalt. Die dünne Oberfläche ist schwarz, rauh und besitzt viele Oscula. Das Schwammgewebe ist hellbraun, relativ weich und sehr faserig.

I. spinosula ist an den Tauchplätzen vor allem in geringeren Tiefen (ab ca. 1m) sehr häufig. Die in meinen Versuche eingesetzten Individuen entstammen der Bucht von Sant'Andrea aus einer Tiefe von ca. 5m.

Petrosia ficiformis POIRET

Der Habitus dieses Schwammes ist feigen- oder netzförmig, mit sich wieder verbindenden dicken Verästelungen. Oft bildet er auch längliche Strukturen aus. Über die glatte, weinrot-braune Außenhaut sind die großen Oscula unregelmäßig verstreut. Das Mesohyl ist bräunlich, und durch den geringen Gehalt an Spongin hart und brüchig. *P.ficiformis* ist nicht selten und findet sich meist im Halbschatten an Felsen wachsend ab ungefähr 3m Tiefe. Die von mir bearbeiteten Schwammproben wurden in der Bucht von Sant'Andrea in 11 bis 14m Tiefe genommen.

Unter Einfluß von Ethanol verfärbt sich der Schwamm rosa. Der Extrakt ist grün.

Hamigera hamigera SCHMIDT

Hamigera hamigera bildet in einer Tiefe von 5 bis 15m fleischige Krusten, die meist senkrechte Felsen überziehen. Er ist auffällig dunkelrot und auch sein Extrakt ist von sehr intensiver dunkelroter Färbung. Er ist an den Tauchplätzen eher selten, aber an den Orten, an denen man ihn findet, kommt er oft in großen Mengen vor. Vor allem in der Bucht von Sant'Andrea ist er häufig, wo er in einer Tiefe von 5 bis 7m gesammelt wurde.

Agelas oroides SCHMIDT

Eine massige, kugelige Form und ein leuchtendes Orange-Gelb machen diesen Schwamm sehr auffällig. Die Individuen stehen verstreut an schattigen Felswänden ab ungefähr 10m Tiefe. Das Gewebe ist elastisch. Die Oberfläche ist faltig mit großen, unregelmäßig verstreuten Oscula. Die Individuen dieses Schwammes sind eher selten und wurden an der Scoglio della Triglia in 14 bis 20m Tiefe gefunden, kommen aber auch an den anderen Tauchplätzen vor.

Axinella damicornis ESPER

Axinella damicornis besitzt eine kurze abgeflachte Achse, die sich fächerförmig verzweigt. Er ist leuchtend hellgelb gefärbt und sehr biegsam. Die Oberfläche wirkt durch hervorstehende Spicula borstig. Die einzeln wachsenden Individuen sind über sonnige und im Halbschatten liegende Felsen in einer Tiefe von 10 bis 30m verstreut. Oft ist *Axinella* mit Krustenanemonen der Spezies *Parazoanthus axinellae* bewachsen. Der kleine Schwamm tritt an der Scoglio della Triglia relativ häufig auf, wo er in Tiefen um 15m gesammelt wurde. An den anderen Tauchplätzen kommt er seltener vor. Unter dem Einfluß von Ethanol wird die gelbe Färbung des Schwammes vollständig herausgelöst und übrig bleibt graues Gewebe.

Acanthella acuta SCHMIDT

Dieser Schwamm ist in den Gewässern im Bereich des Hydra-Instituts eher selten. Die kleinen Individuen sind dunkelorange und stark verzweigt in kurzen Ästen. Die Konsistenz von *A.acuta* ähnelt der von *Axinella damicornis* und ähnlich wie bei diesem sind auch hier die Individuen einzeln über den Fels verteilt. Er wächst aber meist eher im Schatten in einer Tiefe von 10 bis 40m. Die Individuen wurden an der Scoglio della Triglia gesammelt.

Auch *A.acuta* wird unter dem Einfluß von Ethanol grau.

Ircinia fasciculata SCHMIDT

Wie die gesamte Gattung *Ircinia* besitzt auch *I.fasciculata* einen hohen Anteil an Sponginfasern, die sie lederartig zäh machen. Diese Art besitzt eine massige, manchmal krustenförmige Gestalt und ist an Felsüberhängen relativ häufig. Sie ist braun bis violett gefärbt und hat eine stark strukturierte Oberfläche. Bei Bearbeitung zeigt sich auch hier ein starker pyridinartiger Geruch. Interessant ist die intensiv grüne Färbung des Ethanol-Extraktes. Für meine Untersuchungen wurden Proben in etwa 5m Tiefe in der Bucht von Sant'Andrea entnommen.

Spongia officinalis LINNEE

Spongia officinalis ist als Badeschwamm weithin bekannt. Interessanterweise besitzt er in seiner natürlichen Form eine schwarze, rauhe Oberfläche und hat starke Ähnlichkeit mit dem oben beschriebenen Schwamm *Ircinia spinosula*. Unter Wasser lässt er sich aber leicht durch seine höhere Elastizität von *Ircinia* unterscheiden. Nach Eindrücken der Oberfläche mit dem Zeigefinger federt diese bei *Spongia* sofort wieder in ihre ursprüngliche Position, während bei *I. spinosula* der Fingerabdruck noch eine Weile bestehen bleibt. Weiteres Unterscheidungsmerkmal sind die kleineren Oscula bei *S. officinalis*. Das Mesohyl hat die für den Badeschwamm bekannte gelbbraune Färbung, ist sehr faserig und von großen Kragengeißelkammern durchsetzt.

Spongia officinalis ist etwas seltener als *Ircinia spinosula* aber dennoch an den meisten Tauchplätzen auf Elba vor allem im flacheren Wasser sehr häufig. Die von mir extrahierten Individuen wurden in einer Tiefe von etwa 5m in der Bucht von Sant'Andrea gesammelt.



Abb.3.1.: Aplysina cavernicola



Abb.3.2.: Chondrosia reniformis



Abb.3.3.: Ircinia spinosula



Abb.3.4.: Petrosia ficiformis



Abb.3.5.: *Hamigera hamigera*



Abb.3.6.: *Agelas oroides*



Abb.3.7.: *Axinella damicornis* (rechts mit Krustenanemonen)



Abb.3.8.: *Acanthella acuta*

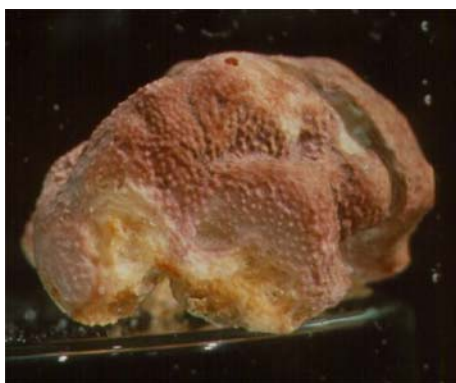


Abb.3.9.: *Ircinia fasciculata*



Abb.3.10.: *Spongia officinalis*

DER CHEMISCHE FRASSSCHUTZ DER MITTELMEER-SCHWÄMME

3.3. Die erhaltenen Rohextraktmengen aus den Schwämmen

Alle Schwämme wurden mit den Lösungsmitteln Methanol (MeOH) und Dichlormethan (DCM) extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit dem Ethanol/Wassergemisch, in dem der Schwamm zur Konservierung gelagert worden war, zu einem Rohextrakt vereinigt, getrocknet und anschließend gewogen. In Tab. 3.1. sind die Gewichte der Rohextrakte, zusammen mit den zugehörigen Frischgewichten und den Volumina des extrahierten Schwammmaterials aufgelistet. Außerdem ist die aus je 10ml Schwammgewebe stammende Extraktmenge aufgelistet, die in den Fütterungsexperimenten in die Futterstücke eingearbeitet wurde.

Die HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte sind im Anhang in den Abbildungen A.11.-A.20. aufgeführt.

Tab. 3.1.: Extraktionsdaten

Schwamm	Frischgewicht des extrahierten Materials [g]	Volumen des extrahierten Materials [g]	Extraktgewicht gesamt [g]	Extraktgewicht aus 10 ml Schwammgewebe [g]
<i>A.cavernicola</i>	390	375	20,45864	0,54556
<i>C.reniformes</i>	360	258	11,01855	0,37035
<i>I.spinosula</i>	375	357	13,37350	0,37446
<i>P.ficiformis</i>	190	178	7,83155	0,44104
<i>H.hamigera</i>	366	343	18,09775	0,52808
<i>A.oroïdes</i>	80	71	5,24926	0,73979
<i>A.damicornis</i>	106	102	5,29588	0,51920
<i>A.acuta</i>	79	75	3,10868	0,41721
<i>I.fasciculata</i>	111	100	4,05118	0,40626
<i>S.officinalis</i>	389	381	15,05551	0,39515

3.4. Die fraßhemmende Wirkung der Rohextrakte

Jeder Schwammrohextrakt wurde in zwei Durchgängen mit je sechs Futterstreifen im Fütterungsversuch getestet. Abb.3.11. stellt die Intensitäten der Fraßhemmungsaktivität, die als Anteil des abgefressenen Kontrollfutters am gesamten abgefressenen Futter eines Futterstreifens definiert wurden, dar (siehe 2.4.2.). Im Anhang, in den Abb.A.1.-A.10. sind die Futtermengen, die jeweils von Extraktfutterstück und Kontrolle abgefressen wurden, dargestellt. Mit Hilfe eines t-Tests für verbundene Stichproben wurde bestimmt, ob sich die Mittelwerte der Futtermengen, die von Kontrolle und behandeltem Futterstück in den Fütterungsversuchen mit den jeweiligen Schwammextrakten abgefressen worden waren, signifikant unterscheiden. Tab.3.2. gibt die ermittelten Signifikanzen wieder.

Ein hoher Anteil der untersuchten Extrakte erwies sich in den Fütterungsversuchen als fraßhemmend auf *Blennius sphinx*: Bei sieben der zehn getesteten Schwammextrakte zeigten die Fische eine signifikante Präferenz für die unbehandelte Kontrolle. Es kann dabei in zwei Gruppen unterschiedlicher Aktivität unterschieden werden: während die Futterstücke, die mit Extrakten von *A.cavernicola*, *A.roides* und *A.damicornis* behandelt worden waren, nur geringfügige Bißspuren aufwiesen, wurden von Futterstücken mit Extrakten von *H.hamigera*, *A.acuta*, *I.fasciculata* und *S.officinalis* deutlich größere Mengen abgefressen.

Auch bei den Extrakten von *C.reniformis*, *P.ficiformis* und *I.spinosula* liegt die ermittelte mittlere Fraßhemmungsaktivität über 50%. Eine signifikante Präferenz der Fische für die Kontrolle läßt sich bei diesen Extrakten aufgrund der hohen Standardabweichungen, die sich in den Versuchen ergaben, nicht erkennen.

Alle getesteten Schwammextrakte wiesen zumindest tendenziell eine Fraßhemmungsaktivität auf. Dennoch wurden im Laufe der Fütterungsversuche insgesamt große Mengen des mit Extrakt behandelten Futters gefressen. Selbst bei dem Extrakt von *A. damicornis*, der die intensivste fraßhemmende Wirkung aufwies, zeigten die behandelten Futterstücke kleine Fraßspuren. Aussagen, welcher Anteil der abgefressenen Menge tatsächlich von den Fischen aufgenommen, und wieviel nach

dem Probieren wieder ausgespuckt wurde, lassen sich nur schwer machen. Aus der geringen Menge an abgerissenem Futter, die sich nach den Experimenten im Aquarium befand, kann aber mit großer Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß auch ein guter Teil des behandelten Futters in die Mägen der Fische gelangte. Dennoch ließen sich keine erhöhte Sterblichkeit oder Verhaltensänderungen bei den Versuchsfischen feststellen, die sich direkt auf die Folgen eines Fütterungsversuches hätten zurückführen lassen.

Tab. 3.2: Signifikanzen der Unterschiede zwischen der Anzahl der freigefressenen Fliegengitterkästchen unter dem behandelten Futterstück und der Kontrolle (ermittelt mit dem t-Test für verbundene Stichproben); Für $P < 0,05$ ist der Unterschied signifikant.

Schwamm	Signifikanzwert p (n=6)	
	Versuch 1	Versuch 2
<i>A.cavernicola</i>	0,000002	0,000005
<i>C.reniformes</i>	0,155404	0,137014
<i>I.spinosula</i>	0,360717	0,078741
<i>P.ficiformis</i>	0,395691	0,107504
<i>H.hamigera</i>	0,000382	0,002165
<i>A.oroides</i>	0,000009	0,000437
<i>A.damicornis</i>	0,000035	0,000168
<i>A.acuta</i>	0,004830	0,003202
<i>I.fasciculata</i>	0,002136	0,000617
<i>S.officinalis</i>	0,000054	0,003796

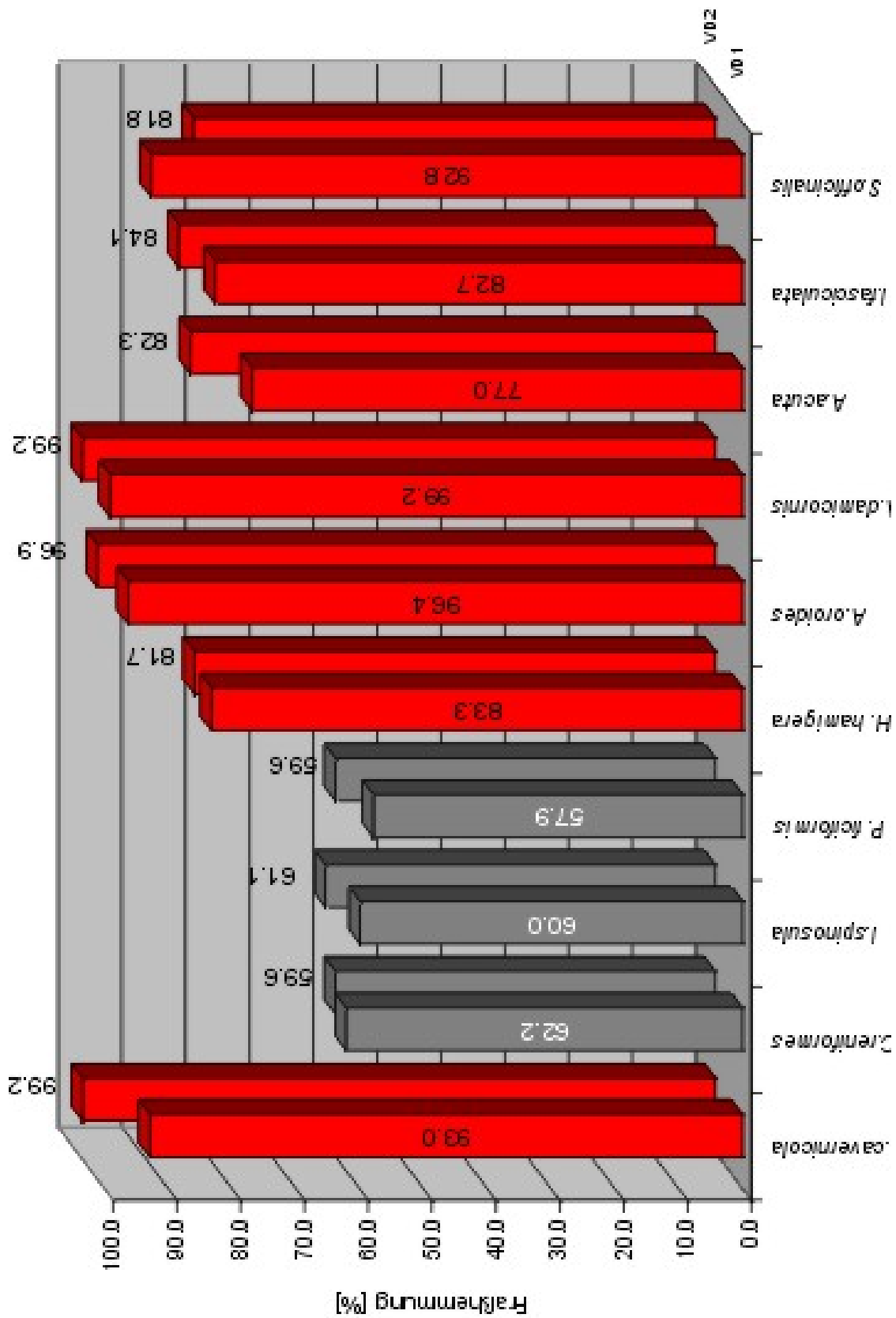


Abb.3.11.: Fraßhemmungsintensitäten der Schwammrohextrakte auf *Blennius sphinx* (gemessen am Anteil der von der Kontrolle gefressenen Futtermenge am gesamten gefressenen Futter); jeder Schwammextrakt wurde in zwei Versuchsdurchgängen (VD1 und VD2) mit je 6 Futterstreifen getestet; Fütterungsversuche bei denen eine signifikante Fraßhemmungsaktivität der Extrakte ermittelt wurden sind **rot**

3.5. Der Zusammenhang zwischen der Fraßhemmungsaktivität der Rohextrakte und dem Nährstoffgehalt der Schwämme

Der Anteil des Stickstoffs und des Kohlenstoffs am Gewebe der Schwämme wurde von der Arbeitsgruppe Kaiser am Botanischen Institut der Universität Würzburg gemessen. Als Vergleichswert wurden zusätzlich die Gehalte dieser Elemente im Futtergranulat, das für die Herstellung der Futterstücke verwendet worden war, gemessen. Die erhaltenen Werte sind in Tab.3.3. aufgelistet.

Tab. 3.3.: Ergebnisse der Stickstoff- und Kohlenstoffgehaltsanalyse der Schwämme und des Futtergranulats. Die Werte sind in Prozent des Trockengewichts angegeben.

Probe	N-Gehalt [%]	C-Gehalt [%]
<i>A.cavernicola</i>	9,08	35,19
<i>C.reniformes</i>	10,27	35,84
<i>I.spinosula</i>	10,66	39,46
<i>P.ficiformis</i>	7,13	32,06
<i>H.hamigera</i>	5,05	28,84
<i>A.oroïdes</i>	11,02	35,50
<i>A.damicornis</i>	9,65	36,10
<i>A.acuta</i>	7,29	33,13
<i>I.fasciculata</i>	8,71	32,33
<i>S.officinalis</i>	8,62	32,50
Futtergranulat	7,47	45,03

Zwischen den Stickstoffgehalten der Schwammproben zeigen sich deutliche Unterschiede. Die Werte liegen zwischen 5,05% (*H.hamigera*) und 11,02% (*A.oroïdes*). Für den Kohlenstoff fallen die Schwankungen im Verhältnis deutlich geringer aus. Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte im Gewebe der Schwämme scheinen positiv korreliert zu sein. Sollte ein Zusammenhang zwischen einem der beiden Gehalte und der Intensität des chemischen Fraßschutzes bei den Schwämmen bestehen, so wird sich deshalb diese Wechselbeziehung auch zwischen dem anderen Gehalt und der Fraßhemmungsaktivität der Schwammetaboliten erkennen lassen. Da der Gehalt an

Kohlenstoff aufgrund der leichteren Verfügbarkeit dieser Substanz im Meer einen vergleichsweise geringeren Einfluß auf die Attraktivität der Beute von marinen Organismen hat, wurde im Folgenden nur der Stickstoffgehalt in Betracht gezogen.

In Abb.3.12. ist der gemessene Anteil des Stickstoffs am Trockengewicht der Schwämme gegen das Ausmaß der Fraßhemmung ihrer Extrakte aufgetragen. Die errechnete Regressionsgerade hat die Gleichung $y = 75,139 + 0,6116x$. Der zugehörige Pearson-Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,0726$ und unterscheidet sich nicht signifikant von 0 (getestet mit dem t-Test zur Prüfung des Maßkorrelationskoeffizienten (Köhler et al. 1985) auf einem 5%igen Signifikanzniveau). Es ist damit kein statistisch signifikanter linearer Zusammenhang zwischen diesen Parametern aus meinen Daten ableitbar.

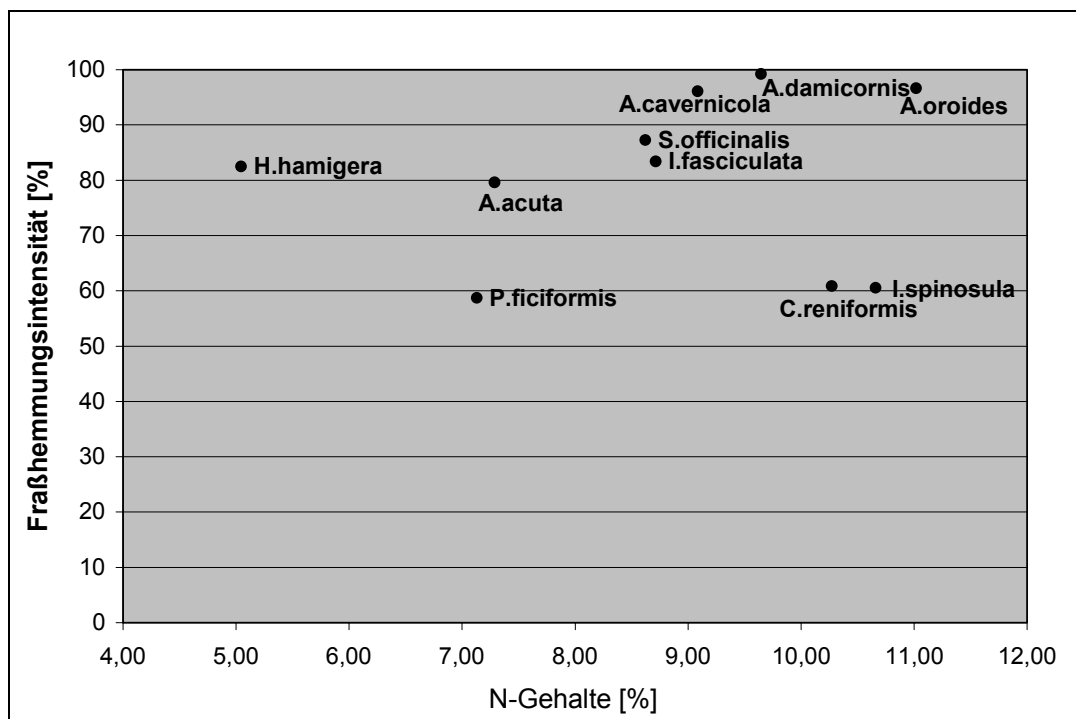


Abb.3.12.: Der Zusammenhang zwischen dem Stickstoffgehalt im gefriergetrockneten Schwammgewebe und der Fraßhemmungsintensität der Rohextrakte auf *Blennius sphinx*

Die Analyse des Futtergranulates ergab, daß der Stickstoffgehalt mit 7,47% nur geringfügig den Mittelwert der in den Schwammgeweben gemessenen Werte (8,75%) unterschreitet. Der Gehalt an Kohlenstoff liegt im Futtergranulat mit 45,03% über dem der Schwämme (34,10%).

DIE FRASSSCHUTZMETABOLITEN DES SCHWAMMES *APLYSINA CAVERNICOLA*

Aus den zehn gesammelten Schwämmen wurde der Schwamm *Aplysina cavernicola* für eingehendere Untersuchungen ausgewählt. Ziel war es, die für den chemischen Fraßschutz dieses Schwammes verantwortlichen Substanzen zu identifizieren und zu isolieren.

3.6. Die Fraktionen des Extraktes

Abb. 3.13. zeigt das Schema, nach dem der Rohextrakt von *A.cavernicola* fraktioniert wurde. Jede erhaltene Fraktion wurde im Fütterungsversuch mit *Blennius sphinx* getestet. Mit dem t-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$) wurde ermittelt, welche der Fraktionen eine signifikant fraßhemmende Wirkung auf die Fische hatten. Diese Fraktionen wurden weiter aufgetrennt und wiederum in Fütterungsversuchen getestet, bis schließlich die Sekundärmetaboliten des Schwammes in Reinform auf ihre Fraßhemmungsaktivität überprüft werden konnten.

Nach der ersten Auftrennung des Rohextraktes (Abb.A.11., Anhang) zwischen Ethylacetat und Wasser wurden beide erhaltenen Phasen im Fütterungsversuch getestet. Es zeigte sich, daß sowohl die Wasser- als auch die Ethylacetatphase fraßhemmende Metaboliten enthielt. Während in der Wasserphase (Abb.A.22., Anhang) eine Komponente, die als das Pigment (Abb.A.33.+A.34., Anhang) des Schwammes identifiziert wurde, dominierte, handelte es sich bei der Ethylacetatphase (Abb.A.21., Anhang) um ein Gemisch aus mehreren Substanzen. Hier wurden zunächst die lipophilen Komponenten durch Ausschütteln zwischen MeOH/Wasser und Cyclohexan abgetrennt. Beide Phasen wurde im Fütterungsversuch getestet, doch nur die Komponenten in der MeOH/Wasser-Fraktion wiesen eine signifikant fraßhemmende Wirkung auf.

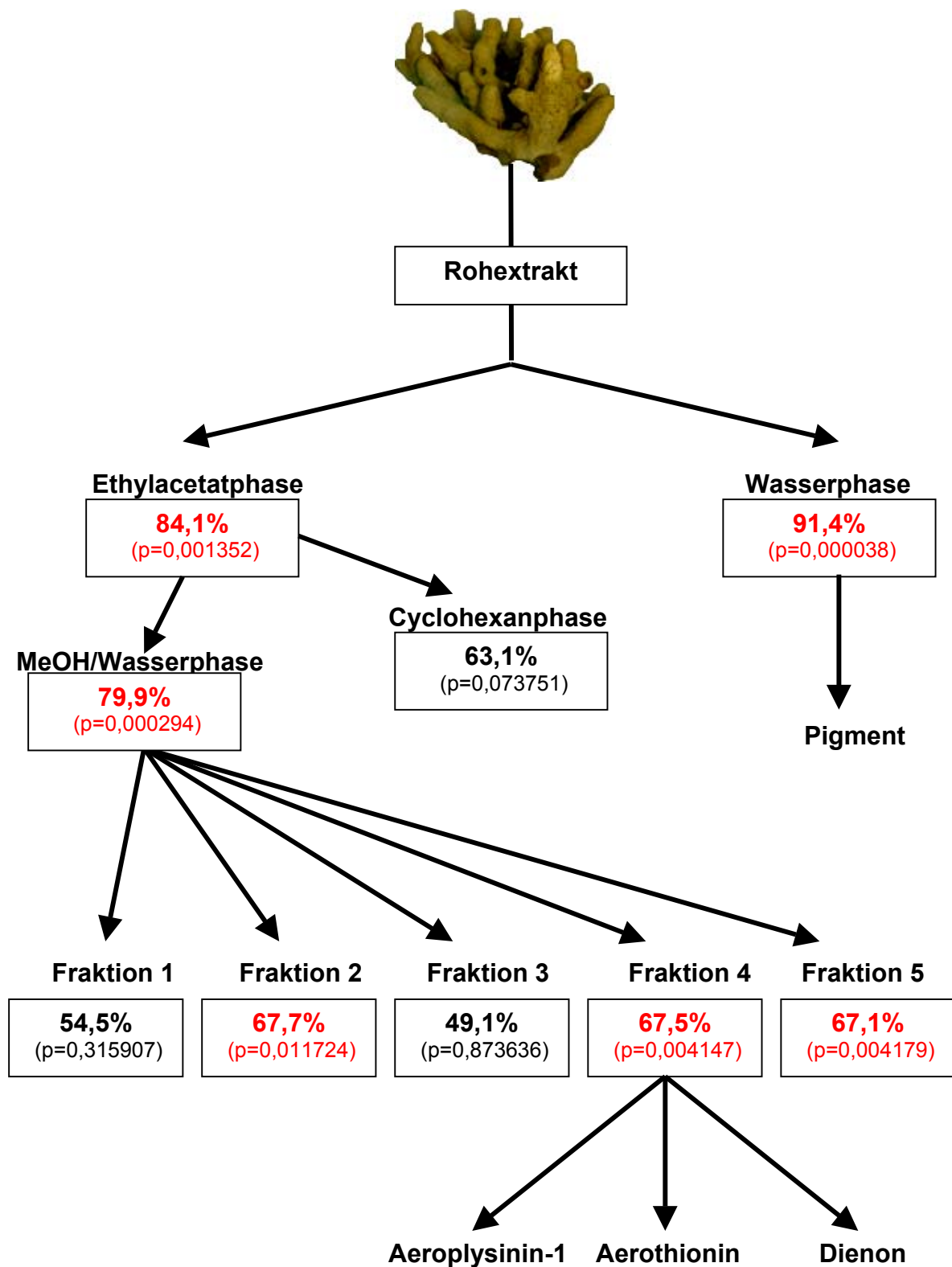


Abb.3.13.: Die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Fraktionen des Rohextraktes von *A.cavernicola*. Zu jeder Fraktion ist die Fraßhemmungsintensität und der Signifikanzwert des t-Tests angegeben. Bei signifikant fraßhemmender Aktivität der Fraktionen sind die Zahlenwerte rot dargestellt.

Die Komponenten der polaren MeOH/Wasser-Phase (Abb.A.23.Anhang) wurden anhand ihrer Molekülgrößen in fünf Fraktionen aufgetrennt, wovon drei eine signifikante Fraßhemmung zeigten. In Fraktion 4 (Abb.A.25., Anhang) wurden die Metaboliten Aeroplysinin-1, Aerothionin, und Dienon identifiziert. Fraktion 5 (Abb.A.26.,Anhang) enthielt Rückstände des im ersten Fraktionierungsschritt abgetrennten Pigmentes und in Fraktion 2 fand sich eine modifizierte Form des Aerothionins (Abb.A.24., Anhang). Die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Reinsubstanzen sind in Abschnitt 3.9. gesondert behandelt.

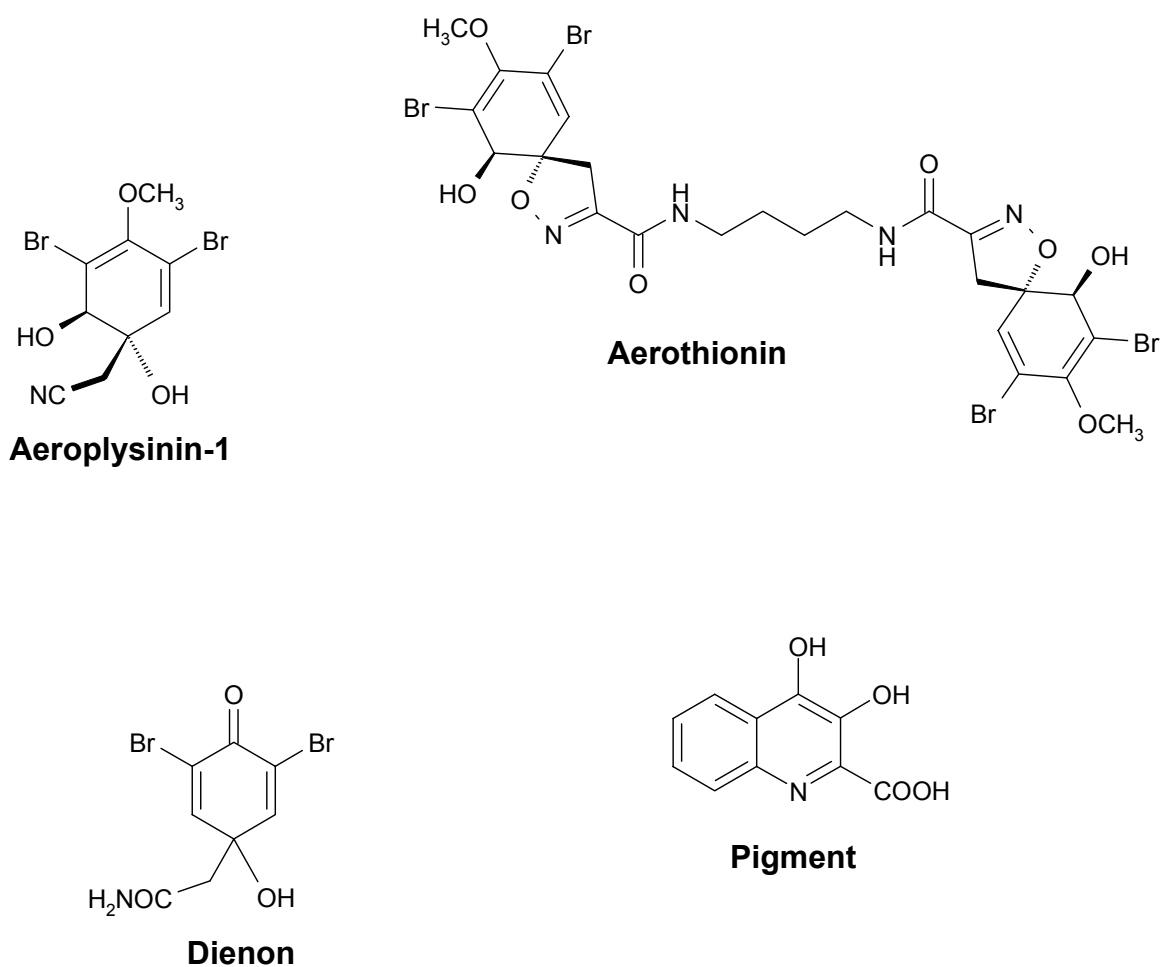


Abb.3.14.: Isolierte Metaboliten aus dem Extrakt von *A. cavernicola*

3.7. Erhaltene Reinsubstanzen

Durch den Fraktionierungsvorgang wurden vier Sekundärmetaboliten des Schwammes isoliert, deren Reinheit anschließend anhand der HPLC-Chromatogramme überprüft wurde (Abb.A.27-A.34. Anhang). Es handelt sich dabei um die in Abb. 3.14. dargestellten bromierten Alkaloide Aeroplysinin-1, Aerothionin und Dienon und die 3,4-Dihydroxychinolin-2-carbonsäure, das Pigment von *A.cavernicola*. Die Reinheit des Pigmentes wurde zusätzlich durch eine NMR-spektroskopische Analyse überprüft.

3.8. Die Konzentrationen der Metaboliten im Schwammgewebe

Durch die Analyse von einer Reihe definierter Konzentrationen der Reinsubstanzen in der HPLC konnten Eichgeraden (Abb.A.35.-A.38., Anhang) gezeichnet werden, anhand derer der Gehalt der Substanzen im Rohextrakt ermittelt werden konnte. Die Quantifizierung der erhaltenen Reinsubstanzen zur Bestimmung ihrer natürlichen Gehalte im Schwammgewebe wurde mit zwei verschiedenen Rohextrakten des Schwammes *Aplysina cavernicola* durchgeführt. Während Extrakt 1 aus Schwammgewebe stammte, das gleich nach der Probennahme eingefroren und anschließend gefriergetrocknet worden war (HPLC-Chromatogramm: Abb.3.15.), war Extrakt 2 aus ethanolkonserviertem Material extrahiert worden (Chromatogramm: Abb.3.16.). Beide Extrakte unterschieden sich wesentlich in der Zusammensetzung ihrer Komponenten.

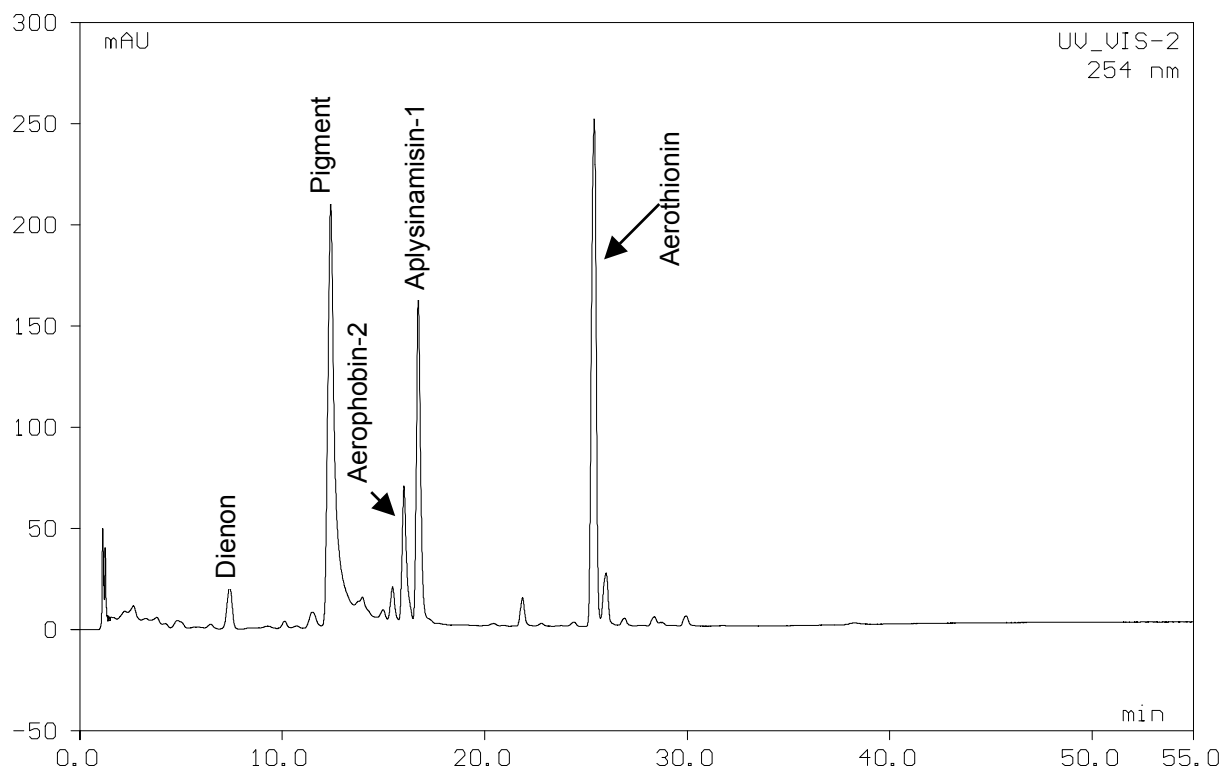
Abb.3.17. gibt die molaren Konzentrationen der quantifizierten Reinsubstanzen in 10ml Schwammgewebe für Extrakt 1 und 2 graphisch wieder. Da der Gehalt des Pigmentes die Anteile der bromierten Alkaloide deutlich übersteigt, kämen bei einer gemeinsamen Darstellung aller quantifizierten Reinsubstanzen im Diagramm die zwischen den beiden Extrakten aufgefundenen Differenzen im Gehalt der bromierten Alkaloide nicht mehr zur Geltung. Aus diesem Grund wurde der Pigmentgehalt nicht im Schaubild dargestellt. In Tab.3.5. sind die Zahlenwerte zum Gehalt aller quantifizierten Reinsubstanzen einschließlich des Pigmentes aufgeführt.

Tab.3.5.: Gehalte der quantifizierten Reinsubstanzen in 10ml Schwammgewebe von *A.cavernicola*

Substanz	Gehalt im eingefrorenen Schwammmaterial [μmol] (Extrakt 1)	Gehalt im ethanol-konservierten Schwamm-material [μmol] (Extrakt 2)
Aerothionin	84,90	4,53
Aerophysinin-1	Nicht nachweisbar	12,96
Dienon	16,85	68,80
Pigment	483,75	665,08

Neben den in Tabelle 3.5. aufgeführten Substanzen enthält Extrakt 1 weitere Komponenten. Die Peaks zur Retentionszeit von ca. 16min in Abb.3.15. konnten anhand ihres UV-Spektrums als Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 identifiziert werden. Abb.3.16. zeigt keine Signale dieser Metaboliten.

Leider war es für keine der beiden Substanzen möglich, Mengen aus dem vorhandenen Schwammmaterial zu isolieren, die für eine weitere Bearbeitung ausgereicht hätten. Eine Quantifizierung des Aerophobin-2 und des Aplysinamisin-1 in den Extrakten war deshalb nicht durchführbar.

**Abb.3.15.:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes aus dem zur Konservierung eingefrorenen Gewebe (Extrakt 1)

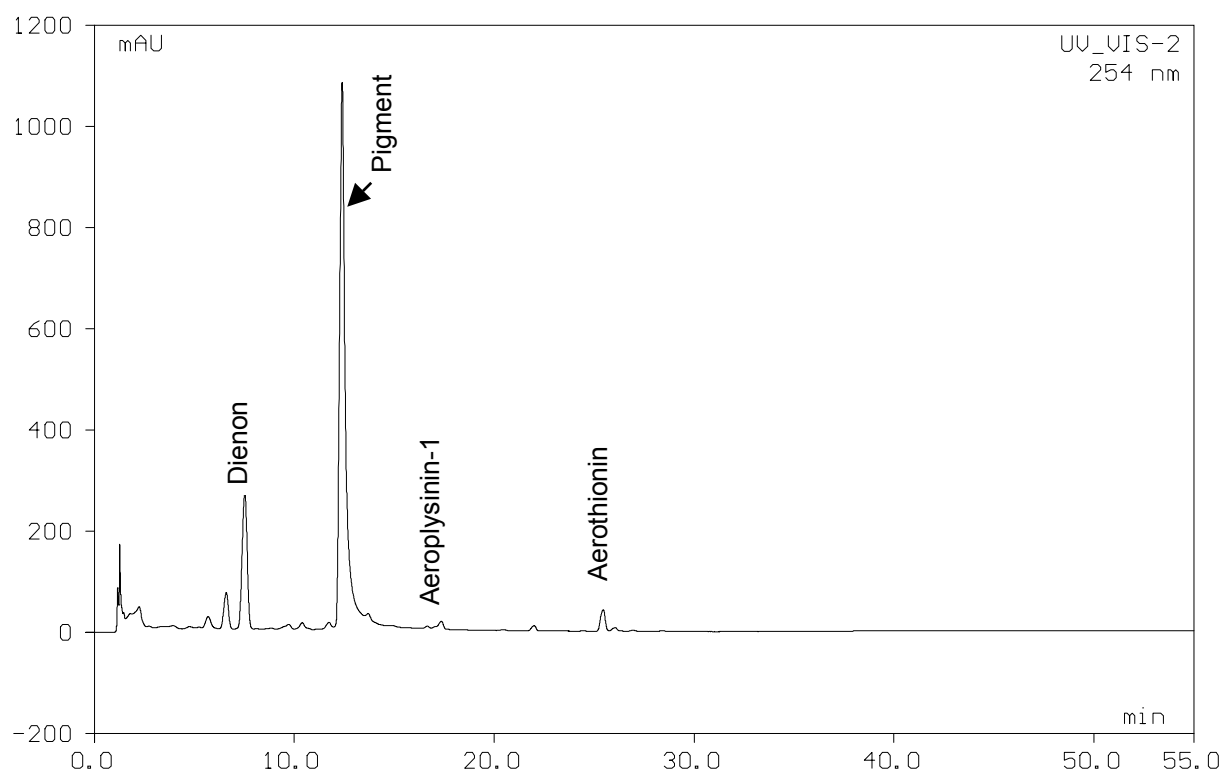


Abb.3.16: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes aus dem ethanol konservierten Gewebe (Extrakt 2)

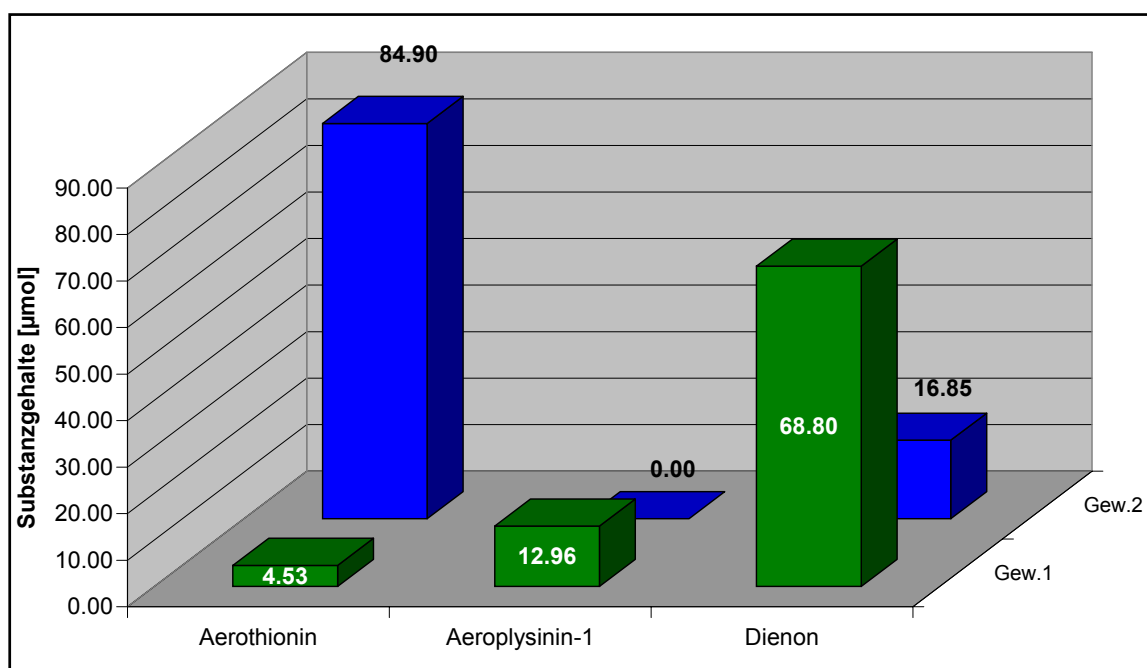


Abb.3.17.: Gehalte der quantifizierten bromierten Alkaloide in 10ml des zur Konservierung eingefrorenen und anschließend gefriergetrockneten Gewebes (Gew.1) und des ethanol konservierten Gewebes (Gew.2) von *A.cavernicola*.

3.9. Die fraßhemmende Wirkung der isolierten Reinsubstanzen

Nachdem die Reinsubstanzen isoliert und in 10ml Schwammgewebe quantifiziert worden waren, konnten die Metaboliten in ihrer natürlichen Konzentration in die Futterstücke eingearbeitet werden. Wie in 3.8. beschrieben, waren in den beiden mit verschiedenen Methoden konservierten Gewebestücken des Schwammes verschiedene Gehalte der bromierten Alkaloide aufgefunden worden. Ihre Einarbeitung in die Futterstücke erfolgte nun in ihrer jeweils höheren Konzentration:

Dienon und Aeroplysinin-1 wurden entsprechend der Konzentration, die im ethanolkonservierten Schwamm aufgefunden worden war, in die Futterstücke eingearbeitet, während Aerothionin in der im zur Konservierung eingefrorenen Schwammgewebe gemessenen Konzentration im Fütterungsversuch eingesetzt wurde. Für jede Substanz wurden zwei Versuchsdurchgänge mit jeweils sechs Futterstreifen durchgeführt. Für Aerothionin konnten im zweiten Versuchsdurchgang nur vier Parallelen getestet werden, da nicht ausreichend Reinsubstanz zur Verfügung stand.

Das Pigment wurde in beiden Konzentrationen, in der des eingefrorenen und des ethanolkonservierten Schwammgewebes, in die Futterstücke eingearbeitet, da sich auch hierfür in den beiden unterschiedlich konservierten Geweben unterschiedliche Gehalte ergeben hatten. Abb.3.18. stellt die Fraßhemmungsintensität der Reinsubstanzen in einem Balkendiagramm dar. In Abb.A.39.-A.42. im Anhang sind die gefressenen Mengen von Kontrolle und behandeltem Futter aufgeführt. Tab.3.6. zeigt die Signifikanzwerte der Fraßhemmung.

Wie aus Abb.3.18. ersichtlich, trägt sowohl das Pigment als auch das Aerothionin wesentlich zur fraßhemmenden Wirkung des unbeschädigten Schwammes bei. Die Metaboliten zeigen ein ähnliches Ausmaß an Fraßschutz.

Aeroplysinin-1 und Dienon besitzen in der im ethanolkonservierten Gewebe ermittelten Konzentrationen keine signifikant fraßhemmende Wirkung. In der molaren Konzentration, die für Dienon in Extrakt 2 bestimmt wurde, besitzt das Aeroplysinin-1 eine Fraßhemmungsaktivität, die etwas unter der des Aerothionins und des Pigmentes in der Konzentration im Extrakt 1 liegt.

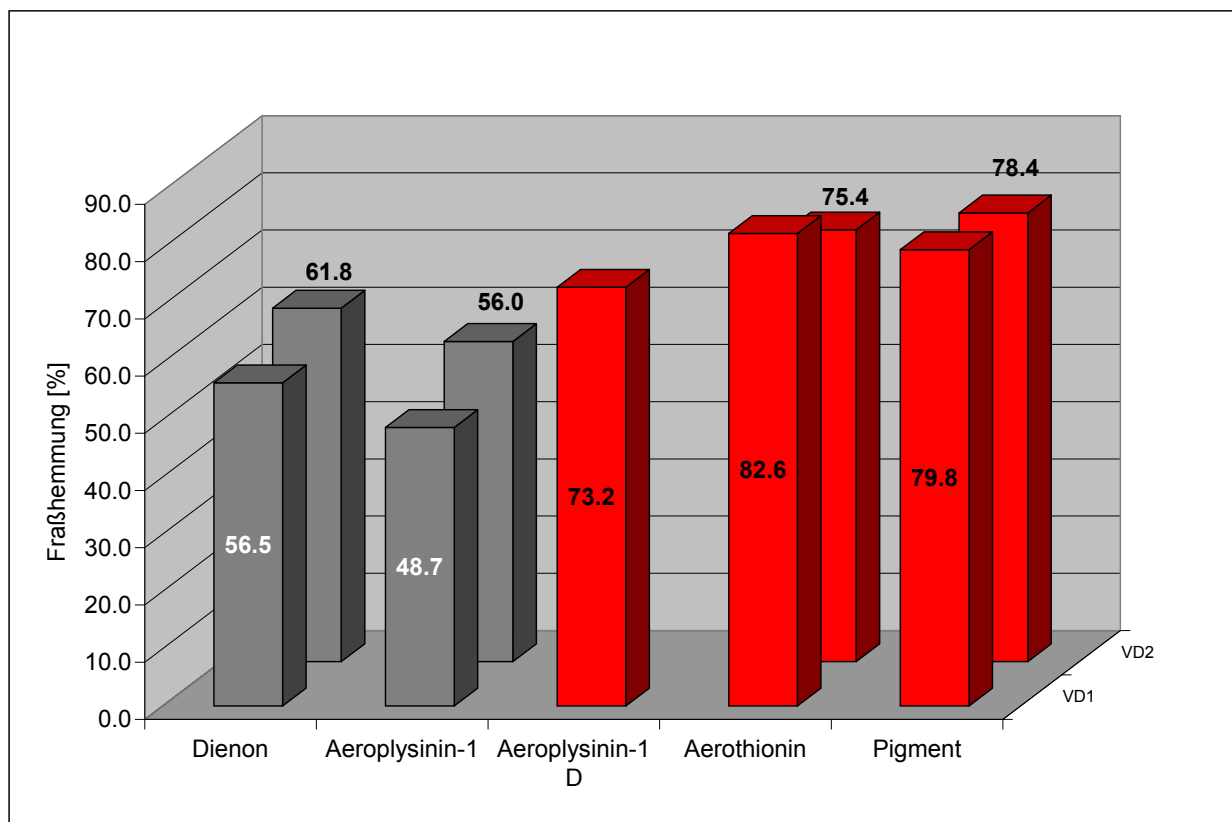


Abb. 3.18.: Die Fraßhemmungsintensitäten der Reinsubstanzen in Fütterungsversuchen mit *Blennius sphinx*. Für alle Substanzen fanden mindestens zwei Versuchsdurchgänge statt (VD1 und VD2); Aeroplysinin-1 wurde zusätzlich in der Konzentration des Dienons getestet (D); das Pigment wurde in den Konzentration in Gewebe 1 und 2 getestet. Die Ergebnisse der Fütterungsversuche, in denen eine signifikante Fraßhemmung der Reinsubstanzen ermittelt wurde sind rot dargestellt (getestet mit t-Test für verbundenen Stichproben)

Tab. 3.6.: Signifikanzen der Unterschiede zwischen der Anzahl der freigeessenen Fliegengitterkästchen unter dem behandelten Futterstück und der Kontrolle (ermittelt mit dem t-Test für verbundene Stichproben); Für $p < 0,05$ ist der Unterschied signifikant. Signifikante Werte sind **fett** gedruckt.

Metabolit	Signifikanzwert p	
	Versuch 1	Versuch 2
Aerothionin (n=6)	0,000395	
Aerothionin (n=4)	0,009326	
Aeroplysinin-1 (n=6)	0,569026	0,095689
Aeroplysin-1 (n=6) i. Dienonkonz.	0,003621	
Dienon (n=6)	0,322022	0,072718
Pigment in hoher Konz. (n=6)	0,001649	
Pigment in niedriger Konz. (n=6)	0,014051	

4. Diskussion

Schwämme besitzen eine erstaunlich große Zahl verschiedener und in ihrer Produktion teilweise sehr aufwendiger Sekundärmetaboliten. Bei vielen dieser Substanzen wird ein ökologischer Nutzen für den Schwamm vermutet (z.B. Uriz et al. 1991, Braekman & Daloze 1986). Die Erkenntnis, daß die höchsten Konzentrationen der bioaktiven Sekundärmetaboliten oft in exponierten Gewebeteilen des Schwammes zu finden sind, (Schupp et al. 1999, Thomson et al. 1983) und die Beobachtung, daß das Auftreten dieser Metaboliten häufig mit dem Ausmaß an ökologischen Streßfaktoren korrelierbar ist (Bakus 1981, Porter & Targett 1988), machen es wahrscheinlich, daß der hohe energetische Aufwand, den die Schwämme in die Produktion dieser Substanzen investieren, durch verschiedene ökologische Vorteile entschädigt wird. Häufig läßt sich die Bioaktivität der Schwammmetaboliten auch relativ einfach durch einen Test der Wirkung auf verschiedene Organismen nachweisen. Meist jedoch bedarf es eines erheblich größeren Aufwandes um zu ermitteln, ob die zur Testung der Bioaktivität der Sekundärmetaboliten gewählten Bedingungen tatsächlich Rückschlüsse auf die natürlichen Gegebenheiten zulassen und inwieweit die gefunden Aktivitäten der Substanzen dem Schwamm auch wirklich einen Nutzen bringen.

So kann beispielsweise schon die Methode zur Extraktion des Schwammmaterials erheblichen Einfluß auf die Ergebnisse der mit dem Extrakt durchgeführten Bioassays haben, indem sie die Zusammensetzung seiner Komponenten beeinflusst (McClintock et al. 1997, Becerro et al. 1997a). Gleiches gilt für die Wahl der Testbedingungen und, nicht zuletzt, für die verwendeten Versuchsorganismen (Pennings et al. 1994, Waddell & Pawlik 2000). Häufig ist es schwierig, die Experimente an Organismen durchzuführen, die unter natürlichen Bedingungen auch tatsächlich ihren Lebensraum mit dem der Schwämme teilen. Statt dessen wird auf einfacher verfügbare Lebewesen aus anderen Habitaten zurückgegriffen. Und selbst wenn Organismen aus der Nachbarschaft der Schwämme für die Versuche herangezogen werden ist es häufig nicht möglich, die Versuche am Originalstandort der Schwämme durchzuführen, so daß die natürlichen Bedingungen im Labor simuliert werden müssen. Aufgrund der großen Zahl an möglichen Einflußfaktoren, die auf den Schwamm und seine Umgebung im Meer einwirken können, kann eine solche Simulation im Labor aber nie wirklich perfekt sein.

Somit lassen sich Aussagen, die anhand der Ergebnisse einer Testreihe dieser Art gemacht werden, nur unter Berücksichtigung der vorhandenen Fehlerquellen und bezogen auf die angewendeten Versuchsbedingungen formulieren. Werden die daraus gewonnenen Erkenntnisse auf die tatsächlichen Bedingungen im natürlichen Lebensraum übertragen, so ist dies stets mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

Aus diesem Grund möchte ich der Diskussion meiner Ergebnisse die Darstellung der möglichen Fehlerquellen und Einschränkungen, die sich aus der Wahl meiner Versuchsbedingungen ergaben, voranstellen. Darüber hinaus soll erläutert werden, welche Strategien verfolgt wurden, um die Ergebnisse möglichst generell formulierbar zu machen, und wie versucht wurde, potentielle Fehlerquellen einzuschränken.

Die Probenahme der Schwämme

Proben einer Schwammart wurden stets von nur einem Standort entnommen. Soweit wie möglich wurden dabei ganze Individuen gesammelt. Häufig mußten mehrere Individuen für eine Probe verwendet werden, um ausreichend Material für die weitere Bearbeitung zu erhalten.

Für viele Schwammspezies sind Schwankungen im Gehalt und der Zusammensetzung der Sekundärmetaboliten bekannt, die durch unterschiedliche Einflußfaktoren an verschiedenen Standorten erklärt werden (Jackson 1975, Uriz et al. 1991, 1992, Becerro et al. 1997b). Auch Schwankungen im jahreszeitlichen Verlauf wurden beschrieben (Turon et al 1996, Becerro et al. 1997b, Betancourt-Lozano 1998). Solche Unterschiede können durch die für meine Untersuchungen angewendete Methode der Probennahme nicht zum Tragen kommen. Aussagen über die fraßhemmende Wirkung einer Schwammart lassen sich damit nur bezogen auf das untersuchte Individuum am jeweiligen Standort machen. Inwieweit die Zusammensetzungen der Rohextrakte Schwankungen aufgrund von Standortunterschieden unterworfen sind, muß dann in weiteren Untersuchungen ermittelt werden. Die von mir angewendete Methode liefert nur unter dem Vorbehalt solcher Schwankungen absolute Aussagen über die fraßhemmenden Eigenschaften der jeweiligen Schwammarten. Ein Vergleich der relativen Unterschiede der Fraßhemmung zwischen den Angehörigen zweier Schwammarten bei weitestgehend gleichen Umweltbedingungen ist mit der

angewendeten Methode aber durchaus möglich. So wurden alle Schwämme außer *A.cavernicola* in einer Tiefe bis zu 15m auf halbschattigen bis schattigen Felsen gesammelt. Stärkere Wasserströmungen wurden bei keinem der Tauchgänge beobachtet. Die Orte der Probenahme liegen nicht weiter als 20km voneinander entfernt. Es ist also zu erwarten, daß die untersuchten Schwämme ihren Fraßschutz unter ähnlichen äußeren Bedingungen entwickelt haben.

Neben intraspezifischen Schwankungen der Metabolitenzusammensetzung sind auch Konzentrationsunterschiede innerhalb des Gewebes von Individuen beobachtet worden (Turon et al. 1996 , Becerro et al. 1995, Schupp et al.1999). In den genannten Arbeiten wird angenommen, daß diese Unterschiede der „Optimal Defense Theory“, die von McKey 1979 ursprünglich für Pflanzen formuliert wurde, folgen. Danach werden in ihrer Produktion aufwendige Sekundärmetaboliten, die dem Schwamm als Schutz gegen Einflußfaktoren von außen nützlich sein können, vermehrt in außenliegende Gewebeteile eingelagert. Da durch die Sammlung und Extraktion ganzer Individuen die fraßhemmende Wirkung des Gesamtgewebes integriert wurde, wurden solche Konzentrationsunterschiede unterschlagen. Damit ist es möglich, daß der Fraßschutz einer Schwammart, die sich durch hohe Konzentrationen von fraßhemmenden Metaboliten in der Außenschicht schützt, in meinen Untersuchungen unterschätzt wird.

Methoden zur Konservierung des Schwammmaterials

Wie sich durch den Vergleich der Extrakte aus den beiden unterschiedlich konservierten Gewebeteilen des Schwammes *Aplysina cavernicola* erwiesen hat, kann die Konservierungsmethode durchaus einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Komponenten im Gewebe des bearbeiteten Schwammes haben. Es ist anzunehmen, daß im Ethanol/Wasser-Gemisch des ethanolkonservierten Schwammgewebes von *A.cavernicola* die in der Einleitung beschriebene und für die Familie der Aplysinidae typische enzymatische Biotransformation der Extraktkomponenten stattgefunden hat (siehe Einleitung 1.5.). Will man eine solche Enzymreaktion im zu untersuchenden

Schwammgewebe verhindern, so scheint, zumindest bei *A.cavernicola*, nur eine Konservierung durch Einfrieren direkt nach der Probenahme wirkungsvoll zu sein.

Sollte es also neben *A.cavernicola* in meiner Versuchsreihe weitere Schwämme geben, in deren Gewebe eine durch Zellbeschädigung induzierte Enzymreaktion stattfindet, so ist es wahrscheinlich, daß das Ausmaß der Fraßhemmung in meinen Fütterungsversuchen durch die Ethanolkonservierung jeweils dem Zustand des verletzten Schwammgewebes entspricht.

Es ist schwer abzuschätzen, ob der Zustand nach vollständigem Ablaufen einer solchen verletzungsinduzierten Enzymreaktion den Zustand des Gewebes unter den Bedingungen, mit denen die Fraßfeinde der Schwämme tatsächlich konfrontiert sind, widerspiegelt. Ohne Zweifel werden durch einen Biß eines Fisches Zellen des Schwammes beschädigt. Wenn die Gegebenheiten für eine verletzungsinduzierte Enzymreaktion vorhanden wären, würde eine solche also in diesen Zellen induziert werden. Unsicher ist jedoch, wie viele Zellen durch den Biß beschädigt werden. Dies ist stark von der Größe des jeweiligen Fraßfeindes und der Art und Weise, wie die Gewebeteile vom Schwamm abgefressen werden, abhängig. Werden große Brocken herausgerissen, so findet zunächst nur eine Beschädigung der Zellen an der Oberfläche statt. Erst im Magen des Räubers kommt es zu einer Zersetzung der restlichen Zellen. Damit entstehen im Maul des Tieres vermutlich nur wenige Produkte der Enzymreaktion. Werden jedoch kleine Gewebestücke abgeraspelt, so wird ein deutlich größerer Anteil der Zellen schon im Maul des Fraßfeindes beschädigt.

Blennius sphinx ist ein sehr kleiner Fisch und die abgefressene Menge pro Biß entspricht wohl kaum mehr als einigen Zellagen. Wie viele Reaktionsprodukte aber tatsächlich auf die Geschmacksnerven des Fisches treffen könnten, bleibt dennoch schwer zu sagen. Hierfür müßte zusätzlich ermittelt werden, in welchem Verhältnis die Geschwindigkeit der jeweiligen Enzymreaktionen und die Verweildauer des gefressenen Materials im Maul des Fisches zueinander stehen.

Mögliche Einflüsse der Bearbeitung der Extrakte auf die fraßhemmende Wirkung

Das Schwammmaterial wurde mit einer Kombination der Lösungsmittel Methanol und Dichlormethan extrahiert. Damit wurde ein weites Polaritätsspektrum der Schwammmetaboliten abgedeckt und verhindert, daß für den Fraßschutz verantwortliche Substanzen im Schwamm zurückbleiben.

Um den erhaltenen Extrakt anlösen und in die Futterstücke einarbeiten zu können, wurden ebenfalls Lösungsmittel verwendet. Nach Mischung des gelösten Extraktes mit dem Futtergranulat wurden diese dann mit dem Rotationsverdampfer entfernt. Um dennoch den Einfluß eines eventuell zurückgebliebenen Lösungsmittelrestes auf die Ergebnisse der Fütterungsversuche zu verhindern, wurde das Kontrollfutter stets mit den gleichen Lösungsmitteln versetzt wie das behandelte Futter. Anschließend wurde es in gleicher Weise mit dem Rotationsverdampfer getrocknet.

Eine Reaktion der Metaboliten und der Lösungsmittel miteinander und daraus resultierende Veränderungen der fraßhemmenden Wirkung der Schwammextrakte lassen sich bei dieser Methode jedoch nicht völlig ausschließen. Um dies so weit wie möglich zu verhindern, wurden die gelösten Extrakte stets gekühlt aufbewahrt.

In den Fütterungsexperimenten verwendete Extraktmengen

Zum Vergleich der chemischen Fraßschutzmechanismen der Schwämme untereinander sollten in meiner Arbeit Extraktkonzentrationen in die Futterstücke eingearbeitet werden, die den Konzentrationen, mit denen Predatoren beim Fressen des Schwammes konfrontiert sind, entsprechen.

Hierfür wurde eine Einarbeitung der Extrakte entsprechend ihres Anteils am Trockengewicht des Schwammes erwogen. Durch den unterschiedlichen Aufbau der Schwämme ergeben sich aber wesentliche Unterschiede im Wassergehalt ihrer Gewebe, die bei der Konzentrationsbestimmung mit dieser Methode nicht zum Tragen kommen. Um trotzdem die fraßhemmende Wirkung der Schwammextrakte vergleichbar zu machen, wäre es deshalb notwendig gewesen, den Wassergehalt jedes

Schwammes in den Futterstücken nachzustellen. Dies wäre aber nur unter erheblichem Aufwand möglich gewesen.

Aus diesem Grund wurde das Volumen des extrahierten Schwammgewebes als Grundlage für die Berechnung der in ein äquivalentes Volumen an Futter einzuarbeitenden Extraktmenge verwendet. Durch diese Methode wird der Wassergehalt der Schwämme berücksichtigt und eine Vergleichbarkeit zwischen den Arten ist eher gegeben. Allerdings kann, abhängig von der Art der Nahrungsaufnahme der Versuchstiere und vor allem bei einer geringen Größe der abgebissenen Futterbrocken, durch diese Methode der Fraßschutz der Schwämme unterschätzt werden, indem der Wasseranteil im abgefressenen Schwammstück geringer ist, als der Anteil am gesamten Schwammgewebe, dessen Volumen ermittelt wurde.

Die Durchführung der Experimente im Aquarium

Die Durchführung der Fütterungsversuche im Aquarium hat gegenüber Freilandexperimenten verschiedene Vorteile. Wichtigster Punkt ist dabei die Kontrollierbarkeit der Versuchsbedingungen. Die Geschwindigkeit, mit der die Futterstücke durch die Fische aufgefunden werden, unterliegt durch die vergleichsweise geringe Individuendichte im Mittelmeer bei Freilandversuchen stark dem Zufall. Im Aquarium hingegen läßt sich durch eine kontrollierte Individuendichte im Bereich der Futterstücke, die Dauer eines Experiments relativ genau steuern. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine eventuelle Wasserlöslichkeit der verwendeten Extrakte ein wesentlicher Faktor. Die Versuche im Aquarium dauerten im Mittel etwa drei Stunden. Eine Tendenz der Abnahme der fraßhemmenden Wirkung zeigte sich während dieser Versuchsdauer nicht. Damit ist nicht zu vermuten, daß im Verlauf der Experimente im Aquarium wesentliche Extraktmengen an das umgebende Wasser verloren gingen. Ist die Dauer der Fütterungsversuche aber, wie in Freilandexperimenten, schwer kontrollierbar und kommt es zu großen Unterschieden in der Präsentationsdauer der mit den verschiedenen Extrakten versetzten Futterstücke, kann der Wasserlöslichkeit der Extrakte wesentlich mehr Bedeutung zukommen.

Ein wesentlicher Vorteil der Aquariumsversuche ist außerdem, daß nur Versuchstiere vom präsentierten Futter fressen, deren Eigenschaften weitgehend bekannt sind und

deren Verhalten zuvor beobachtet wurde. Wie sich an den Vorversuchen mit dem Seeigel *Paracentrotus lividus* zeigte, ist es durchaus möglich, daß Teile des Futters vom Futterstreifen entfernt werden, ohne daß diese tatsächlich gefressen werden. Unter Freilandbedingungen können zudem Wasserströmungen und anthropogene Einflüsse den Versuchsverlauf stören.

Nachteil von Laborversuchen bleibt allerdings, daß die künstlich geschaffenen Bedingungen nur sehr begrenzt den tatsächlichen Zustand im Lebensraum der Schwämme und ihrer Predatoren widerspiegeln. So stehen im natürlichen Lebensraum den Fraßfeinden weit mehr Alternativen zum präsentierten Futter zur Auswahl, als im Aquarium, wo nur zwischen behandeltem Futter und Kontrolle gewählt werden kann. Zudem ist die Individuendichte der Fraßfeinde nicht durch die Aquarienhaltung verfälscht, ein Umstand, der zu Verhaltensweisen der Versuchsfische führen kann, die für die natürlichen Bedingungen untypisch sind. Vor allem aber ist es durch Präsentation des Versuchsfutters am natürlichen Standort der Schwämme möglich, die fraßhemmende Wirkung der Extrakte auf sämtliche im Lebensraum des Schwammes vorkommenden Predatoren zu testen und dabei gleichzeitig mögliche Wechselwirkungen unter den Predatoren zu berücksichtigen. Aus diesem Grund ist ein Vergleich der im Labor erhaltenen Daten mit Ergebnissen aus Freilandexperimenten unverzichtbar. Die Durchführung solcher Experimente ist im Anschluß an die Fertigstellung dieser Arbeit geplant.

DER CHEMISCHE FRASSSCHUTZ DER MITTELMEER-SCHWÄMME

Schwämme sind aufgrund ihrer filtrierenden Ernährungsweise in der Lage, wertvolle gelöste und partikuläre Nährstoffe aus dem Meerwasser in ihrem Gewebe zu fixieren (Reiswig 1974, 1981). Darüber hinaus beherbergen sie häufig Symbionten, die ihre Versorgung mit für sie verwertbaren Zustandsformen des Stickstoffs unterstützen (Rützler 1981, Wilkinson 1983). Die ausreichende Zufuhr von Stickstoff hat generell auf die Produktion bei Meeresorganismen einen wesentlichen Einfluß (Lalli & Parsons 1997). Meist ist der Stickstoff jedoch in seinen für die Meereslebewesen verwertbaren

Formen so knapp, daß er limitierend auf ihre Produktion wirkt. Damit werden Organismen, die große Mengen an Stickstoff enthalten, zur attraktiven Beute. Um einschätzen zu können, inwieweit die untersuchten Schwämme als Beute für potentielle Predatoren attraktiv sind, wurde der Stickstoffanteil am Trockengewicht ihrer Gewebe gemessen. Es ergaben sich Werte, die mit dem Gehalt im handelsüblichen Meerwasserfischfutter vergleichbar sind. Da der Stickstoffbedarf von Aquariumsfischen im Allgemeinen durch das Fischfutter gedeckt wird, ist anzunehmen, daß auch Schwämme für Fische und andere Predatoren im Meer eine wertvolle Stickstoffquelle darstellen könnten. Die Notwendigkeit für die Schwämme, einen wirksamen Fraßschutz zu besitzen, wird damit offensichtlich.

Angesichts dessen ist der hohe Anteil der Schwämme, bei denen in meiner Arbeit ein signifikant wirksamer chemischer Fraßschutz detektiert wurde, nicht erstaunlich. Sieben von zehn der in den Fütterungsversuchen getesteten Schwammarten besitzen Sekundärmetaboliten, die sie als Beuteorganismen für *Blennius sphinx* unattraktiv machen. Bei allen getesteten Schwammextrakten zeigte sich zumindest eine Tendenz der Fische, die unbehandelte Kontrolle zu bevorzugen.

Dieser hohe Anteil an fraßgeschützten Schwämmen stimmt mit Ergebnissen, die Pawlik et al. (1995) für karibische Schwammarten erhalten haben, überein. Hier wurden 71 Schwammextrakte auf ihre fraßhemmende Wirkung gegenüber dem Fisch *Thalassoma bifaciatum* getestet, wovon 69% sich als signifikant fraßhemmend erwiesen. Angesichts der Tatsache, daß sich der Lebensraum Mittelmeer deutlich von den Tropen unterscheidet, erscheint die Übereinstimmung jedoch überraschend.

Charakteristisch für tropische Korallenriffe sind eine sehr hohe Besiedlungsdichte und eine extreme Artenvielfalt (Mebs 1989, Schmahl 1991). Entsprechend stehen die Schwämme dort unter einem Fraßdruck, der wesentlich über dem im Mittelmeer liegt (Grigg et al. 1984, Huston 1985). Da Fraßdruck und Fraßschutz über die evolutiven Anpassungen der Organismen miteinander in Zusammenhang stehen (Bakus 1981) resultiert daraus ein in verschiedenen Arbeiten nachgewiesenes Gefälle in der Intensität der Bioaktivität von Schwammmetaboliten zwischen den Tropen und den höheren Breitengraden (Green 1977b, Vermeij 1978, Proksch 1994, Towne & Pawlik 1996). Es wäre deshalb zu erwarten gewesen, daß sich auch bei den von Pawlik et al. (1995)

untersuchten tropischen Schwämmen einen entsprechend höherer Anteil an signifikant fraßgeschützten Schwämmen zeigt, als bei meinen Mittelmeerschwämmen.

Grund für den hohen Anteil der fraßgeschützten Schwämme in meinen Untersuchungen könnte zum einen die Auswahl der Arten sein, die bei der Probennahme getroffen wurde. Es konnten nur Schwämme von Felsoberflächen, also relativ stark exponierten Standorten gesammelt werden. Nach Bakus (1981) und Neeman et al. (1975) besitzen Invertebraten an exponierten Standorten im Durchschnitt einen deutlich höheren Gehalt an bioaktiven Substanzen, als solche die kryptisch leben. Leider wurde in der Arbeit von Pawlik et al. (1995) nur zwischen Schwämmen unterschiedlicher Habitate unterschieden und es wurden keine Angaben zum Expositionsgrad der verwendeten Individuen gemacht. Eine Vergleichbarkeit der beiden Datensätze ist deshalb nur begrenzt gegeben.

Hinzu kommt, daß die Stichprobe aus zehn Schwammarten, die meiner Arbeit zugrunde liegt, natürlich nur sehr vage Rückschlüsse auf den tatsächlichen Anteil der fraßgeschützten Schwammarten in dem beprobten Lebensraum zuläßt. Dennoch wäre eine Erklärung für eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus den von Pawlik et al. (1995) durchgeführten Untersuchungen und dem Anteil an fraßgeschützten Schwämmen, der aus meinen Arbeiten hervorgeht, denkbar:

Die hohe Dichte an Schwammpredatoren in den Tropen führt neben dem hohen Fraßdruck für die Schwämme auch zu einer starken Konkurrenz unter ihren Fraßfeinden. Damit sind die Predatoren gezwungen, sich an Beuteorganismen anzupassen, auf die sie bei geringerer Konkurrenz verzichten könnten. Cronin et al. (1997) konnten nachweisen, daß Fische aus höheren Breitengraden empfindlicher auf Fraßschutzmetaboliten reagieren als Fische, die in tropischen Gewässern leben. Die Fische der Tropen haben sich also durch den hohen Konkurrenzdruck besser an die Fraßschutzmechanismen ihrer Beuteorganismen angepaßt.

Pawlik et al. (1995) verwendeten in ihren Experimenten den karibischen Fisch *Thalassoma bifasciatum*. *Blennius sphinx*, der Testfisch meiner Arbeit, entstammt dagegen dem Mittelmeer. Damit wurden jeweils Predatoren aus den Lebensräumen der untersuchten Schwämme für die Versuche verwendet. Es wäre also möglich, daß bei einer niedrigeren mittleren Bioaktivität der Extrakte der Schwämme aus dem Mittelmeer,

durch eine höhere Sensibilität der Predatoren, ein vergleichbar wirksamer Fraßschutz wie bei den Schwämmen des Korallenriffs erreicht wird.

Auch wenn ein hoher Anteil der Schwämme sich in meinen Untersuchungen als signifikant fraßhemmend erwies, zeigen sich bei Vergleich der Fraßschutzintensitäten der Schwämme untereinander doch deutliche Unterschiede. Während sich an Futterstücken, die mit Extrakten von *Aplysina cavernicola*, *Agelas oroides* und *Axinella damicornis* behandelt worden waren, kaum Fraßspuren erkennen ließen, wurden große Mengen der Extrakte von *Ircinia spinosula*, *Chondrosia reniformis* und *Petrosia ficiformis* gefressen. Eine dritte Gruppe, bestehend aus *Hamigera hamigera*, *Acanthella acuta*, *Ircinia fasciculata* und *Spongia officinalis* wiesen einen signifikanten Fraßschutz auf und doch wurden sichtbare Mengen des mit ihren Extrakten behandelten Fischfutters abgefressen. Wie kann es zu solch drastischen Unterschieden zwischen Schwämmen, die ihren Fraßschutz alle unter nahezu gleichen Bedingungen entwickelt haben, kommen?

Der Ursprung der Substanzen, die Schwämme vor ihren Fraßfeinden schützen, ist in vielen Fällen nicht sicher ermittelt. Es werden verschiedene Wege, die zur Akkumulation der fraßhemmenden Wirkstoffe im Gewebe des Schwammes führen können, diskutiert (Althoff et al. 1998, Tachibana et al. 1981). Verwenden die untersuchten Schwämme verschiedene Strategien, so wäre denkbar, daß diese unter gleichen Standortbedingungen unterschiedlich stark begünstigt werden und daß daraus Unterschiede im Fraßschutz zwischen den Schwämmen resultieren:

Ein möglicher Weg zum Aufbau eines chemischen Fraßschutzes ist die *de novo*-Synthese durch den Schwamm. Nach der von Bryant et al. (1983, 1989) ursprünglich für Pflanzen formulierten Ressourcen-Verfügbarkeits-Theorie werden Ressourcen erst dann in den Aufbau von chemischen Schutzsubstanzen investiert, wenn ein Überschuß an Ressourcen vorhanden ist, der über den Bedarf hinausgeht, den der Organismus für sein Wachstum hat. Das Ausmaß der Sekundärstoffproduktion wird damit abhängig von der Menge an Nährstoffen, die dem Organismus zur Verfügung stehen. Paul (1992) schließt daraus, daß besonders für Alkaloide, die eine wesentliche Rolle bei der Fraßhemmung von Extrakten mariner Organismen spielen, das Ausmaß der Synthese der Fraßschutzmetaboliten abhängig von der Versorgung mit Stickstoff ist. Damit wird

die Intensität des Fraßschutzes von Schwämmen, die ihre Schutzsubstanzen selbst produzieren, abhängig von ihrer Stickstoffversorgung. Diese kann auf zwei Wegen gewährleistet sein:

Entstammt der Stickstoff, den der Schwamm zur Verfügung hat, im wesentlichen aus der Nahrung, die er aus dem Wasser filtriert, so entsteht ein Zusammenhang zwischen der fraßhemmenden Wirkung des Schwammes und der Verfügbarkeit stickstoffhaltiger Nahrung.

Bezieht der Schwamm den Großteil seines Stickstoffs hingegen aus stickstofffixierenden Cyanobakterien, so ist das Ausmaß seines Fraßschutzes abhängig davon, wieviel Licht an seinem Standort verfügbar ist. So ist beispielsweise der Schwamm *Petrosia ficiformis*, der sich in meinen Fütterungsversuchen als nicht signifikant fraßhemmend erwies, an schattigen Standorten in der Lage, alleine durch heterotrophe Ernährung zu überleben. An sonnigen Standorten hingegen tragen seine Symbionten wesentlich zu seiner Ernährung bei (Arillo et al. 1993). Es ist damit zu vermuten, daß ihm bei ausreichender Lichtintensität ein wesentlich höherer Ressourcenüberschuß zur Verfügung steht, der in die Produktion von Sekundärmetaboliten investiert werden kann. Eventuell wäre also bei Extraktion eines Individuums von einem Standort mit höherer Lichtintensität in meinen Fütterungsversuchen ein stärkerer Fraßschutz für diesen Schwamm ermittelt worden.

Neben der *de novo*-Synthese der Sekundärmetaboliten durch die Schwämme wird in vielen Arbeiten auch eine Synthese durch ihre Symbionten diskutiert (Althoff et al 1998, Friedrich 1998, Brauers 1998, Bewley et al 1996). In diesem Fall müssen die Anforderungen der Symbionten möglichst gut erfüllt werden, um den Fraßschutz für den Schwamm zu maximieren. Sind diese Symbionten photosynthetisch aktiv, so hat auch hier die Lichtverfügbarkeit auf das Ausmaß des Fraßschutzes des Schwammes großen Einfluß.

Die dritte Möglichkeit, die als Ursprung des chemischen Fraßschutzes des Schwammes in Frage kommt, ist die Aufnahme von fraßhemmenden Substanzen aus der Nahrung (Tachibana et al. 1981). In diesem Fall bestimmt die Verfügbarkeit an

Nahrungspartikeln und Organismen, die solche Substanzen enthalten, die fraßhemmende Aktivität der Schwamminhaltsstoffe.

Die Strategie, die angewendet wird, um einen Fraßschutz aufzubauen, folgt damit zwar dem genetischen Plan der Schwämme, kann aber in ihrer Effizienz von Standortfaktoren modifiziert werden. Damit können die Schwammarten an einem Standort unterschiedlich erfolgreich in der Akkumulation von fraßhemmend wirksamen Substanzen sein.

Es gibt aber auch Beispiele für Schwämme, bei denen Standort und geographische Lage nur eine untergeordnete Rolle für die Effizienz des Fraßschutzes zu spielen scheinen. Zwei der von mir bearbeiteten Schwämme zeigen in ihrem Fraßschutz eine erstaunliche Übereinstimmung mit Arten, die der gleichen Familie angehören, die aber der Karibik, und damit einem ganz anderen Lebensraum, entstammen.

Erstes Beispiel ist der Schwamm *Aplysina cavernicola*, der in meinen Fütterungsversuchen als stark fraßhemmend identifiziert wurde. Er gehört der Familie der Aplysindae an, die mit sieben karibischen Vertretern von Pawlik et al. (1995) auf Fraßhemmung gegenüber dem Fisch *Thalassoma bifasciatum* getestet wurde. Alle untersuchten Schwammextrakte wiesen eine starke fraßhemmende Wirkung auf.

Die Sekundärmetaboliten dieser Schwammfamilie wurden bereits vielfach untersucht (Cruz et al. 1990, Acosta & Rodriguez 1992, Teeyapant 1994, Ciminello et al 1996, 1997, Carney & Rinehart 1995). Vor allem für die bromierten Alkaloide zeigen sich bemerkenswerte Übereinstimmungen in den Extrakten der verschiedenen Vertreter dieser Familie. Zwei dieser für die Aplysinidae typischen Alkaloide wurden in meinen Untersuchungen bereits als fraßhemmend identifiziert. Die Übereinstimmungen im Ausmaß der Fraßhemmung lassen sich also vermutlich durch das ubiquitäre Vorkommen der stark bioaktiven bromierten Alkaloide innerhalb dieser Familie erklären.

Agelas oroides, ein weiterer Schwamm meiner Untersuchungen, der einen starken Fraßschutz aufweist, gehört der Familie der Agelasidae an. Von dieser Familie wurden sechs karibische Arten in der Studie von Pawlik et al. (1995) getestet. Alle untersuchten Schwämme erwiesen sich als sehr stark fraßhemmend gegenüber *Thalassoma bifasciatum*.

Aus Extrakten von Agelasidae-Schwämmen wurden bereits verschiedene und teilweise sehr bioaktive Substanzen isoliert. So wurden beispielsweise Untersuchungen mit dem aus *A. oroides* isolierten Oroidin durchgeführt, die ergaben, daß dieser Metabolit stark toxisch auf Vertebraten wirkt, indem er das Membranpotential ihrer Muskelmembran depolarisiert (Escalona de Motta et al. 1991). Der gleiche Metabolit wurde auch in *Agelas clathrodes* gefunden, und es wurde festgestellt, daß er mitverantwortlich für den chemischen Fraßschutz dieses Schwammes ist (Chanas et al. 1996). Es wäre denkbar, daß das Oroidin, oder mit dem Oroidin verwandte Metaboliten, in vielen Vertretern der Agelasidae vorhanden sind, und sich damit die Ähnlichkeit im Ausmaß der Fraßhemmung erklären läßt.

Ein weiteres Beispiel aus den von mir untersuchten Schwämmen läßt vermuten, daß solche verwandtschaftlichen Beziehungen sogar bis auf die Ordnungsebene zu Übereinstimmungen in den Zusammensetzungen der Sekundärmetaboliten führen können. So zeigte sich während meiner Untersuchungen eine interessante Ähnlichkeit in den Extrakten von *Agelas oroides* und *Axinella damicornis*. Darüber hinaus waren sich beide Schwämme im Ausmaß der Fraßhemmung ihrer Extrakte sehr ähnlich. Die Übereinstimmung in der Metabolitenzusammensetzung wurde bereits 1986 von Braekman & Daloze beschrieben und die 4,5-Dibrompyrrole-2-carboxylsäure als ein gemeinsamer Metabolit identifiziert. Chanas et al. (1996) isolierten die gleiche Substanz aus *Agelas clathrodes* und fanden in Fütterungsversuchen heraus, daß sie gemeinsam mit dem Metaboliten Oroidin den Schwamm vor Fraß schützt.

Damit ist wahrscheinlich, daß auch bei *Axinella damicornis* die Dibrompyrrolsäure zu der starken Fraßhemmung beiträgt, die von seinem Extrakt auf *Blennius sphinx* ausgeht.

Axinella damicornis und *Agelas oroides* sind nur über die Ordnung Axinellida miteinander verwandt. Von dieser Ordnung wurden von Pawlik et al. (1995) insgesamt zwölf Vertreter getestet. Alle Extrakte dieser Schwämme besaßen einen signifikanten Fraßschutz, wobei ein Großteil stark fraßhemmend auf den Versuchsfisch *Thalassoma bifasciatum* wirkte.

Die Unterschiede im Ausmaß des chemischen Fraßschutzes zwischen verschiedenen Schwammarten können also in den unterschiedlichen Effizienzen der Strategien, die die Schwämme zur Akkumulation von fraßschützenden Substanzen anwenden, begründet sein. Diese Strategien können genetisch bedingt sein, und von unterschiedlichen Standortfaktoren modifiziert werden, was zu Unterschieden im Fraßschutz zwischen verschiedenen Schwammarten an einem Standort führt. Für manche Schwammarten mag es dabei weniger notwendig sein, einen chemischen Fraßschutz zu besitzen, als für andere, und sie können vorhandene Ressourcen zu einem größeren Anteil in Wachstum und Fortpflanzung investieren (Chanas & Pawlik 1995).

Die Frage bleibt, wie Schwämme, die einen schwach ausgeprägten chemischen Fraßschutz besitzen, sich dennoch für Predatoren als Beute unattraktiv machen und sich so im Laufe der Evolution durchsetzen konnten.

Untersuchungen von Duffy & Paul (1992) zum Freßverhalten von Fischen haben ergeben, daß die Attraktivität der Beute für Fische stark von ihrem Nährstoffgehalt abhängt. Auch Pennings et al. (1994) stellten fest, daß die Wirksamkeit von chemischen Fraßschutzmetaboliten auf Fische in Fütterungsversuchen stark vom Nährwert des präsentierten Versuchsfutters abhängig ist. Denkbar wäre also, daß Schwämme mit schwachem chemischen Fraßschutz durch einen geringen Nährstoffgehalt in ihrem Gewebe für Fische als Beute unattraktiv sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Stickstoffgehalte meiner Schwammproben gemessen und mit den Ergebnissen der Fütterungsversuche verglichen. Es ließ sich kein Zusammenhang erkennen. Schwämme ohne signifikanten chemischen Fraßschutz wiesen teilweise sehr hohe Stickstoffgehalte auf (z.B. *Chondrosia reniformis* und *Ircinia spinosula*), während andere Schwämme mit ausgeprägtem chemischen Fraßschutz (z.B. *Hamigera hamigera*) einen deutlich geringeren Anteil an Stickstoff in ihrem Gewebe haben.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Chanas & Pawlik (1995), als sie einen Vergleich der Ergebnisse aus den Fütterungsversuchen mit karibischen Schwämmen mit deren Proteingehalt anstellten. Wie passen diese Ergebnisse mit den Beobachtungen von Duffy & Paul und Pennings et al. zusammen?

Wenn man davon ausgeht, daß Schwämme neben dem chemischen Fraßschutz auch noch andere Eigenschaften besitzen, die sie vor Fraß schützen, so ist ein direkter Zusammenhang zwischen hohem Nährstoffgehalt und dem Vorhandensein von stark

fraßhemmenden Sekundärmetaboliten nicht mehr zwingend. Viele Schwämme besitzen einen hohen Anteil an Strukturmaterialien und an den für viele Arten charakteristischen Kalk- und Kieselnadeln im Gewebe. Inwieweit Schwämme sich dadurch vor Fraß schützen können, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Uriz et al. 1996, McClintock 1987, Chanas & Pawlik 1995). Problematisch dabei ist, daß sich die morphologischen Eigenschaften in ihrer Wirksamkeit als Fraßschutz schwer einschätzen lassen und deshalb Vergleiche der Schwämme untereinander und Korrelationen des mechanischen Fraßschutzes mit anderen Parametern schwer durchführbar sind. Ist beispielsweise der durch seinen geringen Sponginegehalt harte und brüchige *Petrosia ficiformis* gut fraßgeschützt, oder dient gerade das Spongin, indem es das Gewebe faserig und zäh macht, wie das bei *Ircinia spinosula*, *Ircinia fasciculata* und *Spongia officinalis* der Fall ist, als besonders effektiver Fraßschutz? Können die senkrecht zur Oberfläche stehenden Spiculae von *Axinella damicornis* die Fische vom Fressen des Schwammes abhalten und verhindert der fleischige *Hamigera hamigera* eventuell durch eine schleimige Oberfläche, daß ein Fisch eine Ansatzstelle zum Abbeißen von Schwammmaterial findet? Von *Chondrosia reniformis* ist bekannt, daß er selektiv Quarzpartikel in sein Gewebe einbaut und diese dabei zusätzlich in einheitlicher Weise formt (Bavestrello et al. 1995, 1996). Inwieweit diese Partikel ihm als Fraßschutz nützlich sind, ist aber noch unbekannt. Ohne Eingriffe in den Organismus des Schwammes, die zwangsläufig Auswirkungen auf seine Morphologie und damit die Wirksamkeit des mechanischen Fraßschutzes haben, lassen sich chemischer und mechanischer Fraßschutz nicht voneinander trennen. Aus diesem Grund sind bisher keine sicheren Aussagen über die isolierte Wirkung des mechanischen Schutzes möglich.

Gäbe es nicht noch weitere Faktoren, die den Schwamm vor seinen Fraßfeinden schützen, so wäre das Ausmaß des mechanischen Schutzes einfach als Differenz der Wirksamkeit des Gesamtfraßschutzes (gemessen z.B. an der Anzahl gefundener Fraßspuren am Schwamm) und der Wirksamkeit des experimentell ermittelbaren chemischen Schutzes zu bestimmen. Doch es sind weitere Eigenschaften des Schwammes denkbar, die ihm als Schutz vor Fraßfeinden nützlich sein können.

Hierbei spielt Tarnung eine wesentliche Rolle. Diese kann, wie zuvor schon beschreiben, aus der Wahl eines versteckten oder schlecht zugänglichen Standortes

resultieren (Bakus 1981). Es wäre aber auch möglich, daß ein Schwamm durch eine unauffällige Färbung und Wuchsform seinen Schutz vor Fraßfeinden verbessert. In verschiedenen Arbeiten wird der Einfluß der Farbe auf den Fraßdruck und die Notwendigkeit für einen chemischen Fraßschutz diskutiert (Randall & Hartmann 1968, Pawlik et al. 1995). Da keine direkte Korrelation zwischen den Faktoren gefunden werden konnte, wurde in diesen Arbeiten gefolgert, daß die Farbe bei Schwämmen keinen ökologischen Nutzen erfüllt. Doch ebenso wie beim Vergleich des Nährstoffgehaltes mit dem Ausmaß des chemischen Fraßschutzes ist es auch hier möglich, daß die Einwirkung zusätzlicher Faktoren dazu führt, daß ein Zusammenhang nicht mehr direkt erkennbar wird:

Randall & Hartmann (1968) stellten fest, daß anhand des gefundenen Schwammmaterials in den Mägen von Fischen keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob auffällig gefärbte Schwämme oder solche mit unauffälligen Farben häufiger gefressen werden. Es wäre aber möglich, daß das gefundene Gleichgewicht gerade daraus resultiert, daß auffällige Schwammarten zwar leichter von den Fischen aufgefunden werden, sich aber besonders intensiv auf chemischem oder mechanischem Weg vor Fraß schützen. Wäre dem nicht so, wäre zu vermuten, daß sie, aufgrund ihrer stärkeren Auffälligkeit, den größeren Anteil in den Mägen der Fische ausmachen würden. Damit könnte eine unauffällige Färbung es den Schwämmen ermöglichen, einen geringeren Anteil ihrer Ressourcen in Fraßschutzmechanismen zu investieren. Warum aber besitzen dann viele Schwämme eine derart auffällige Farbe?

Pawlik et al. (1995) versuchten die Frage zu beantworten, ob eine auffällige Färbung bei Schwämmen, ähnlich wie bei manchen Insekten an Land, der Abschreckung von Fraßfeinden dienen kann. Dazu verglichen sie auffällig gefärbte Schwämme mit unauffälligen hinsichtlich ihres chemischen Fraßschutzes. Beide Gruppen erwiesen sich im Mittel als stark fraßgeschützt. Da sich für die Gruppe der auffällig gefärbten Schwämme nur eine etwas stärkere Fraßhemmung ergab, die sich nicht signifikant von der der unauffälligen Schwämme unterschied, schlossen sie, daß der Farbe von Schwämmen eine solche ökologische Funktion nicht zukommt. Geht man in gleicher Weise an die Ergebnisse meiner Fütterungsversuche und die Farbe der untersuchten Schwämme heran, kommt man zu einem ähnlichen Ergebnis:

Alle gelb und rot gefärbten Schwämme sind durch ihre Metaboliten deutlich fraßgeschützt. Von Extrakten der braun bis schwarz gefärbten Schwämme besitzt ebenfalls ein hoher Anteil eine fraßhemmende Wirkung auf die Versuchsfische, so daß kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar ist. Einer Schlußfolgerung auf die ökologische Funktion der Farbe stehen aber dennoch zwei Probleme im Wege:

Erstens ist eine Einteilung der Schwämme in die Kategorien unauffällig und auffällig nicht ohne weiteres möglich. So sind rote Schwämme, wie beispielsweise *Hamigera hamigera* unter den Lichtbedingungen an Land zwar auffällig gefärbt. Unter Wasser ist aber, durch die hohe Absorption von kurzwelligem Licht, ihr Grad an Auffälligkeit stark abhängig von der Lichtintensität an ihrem Standort.

Ein gelber Schwamm ist vor dem Hintergrund dunkler Felsen sehr auffällig. Wächst er aber, wie das beispielsweise für den für meine Untersuchungen gesammelten Schwamm *Aplysina cavernicola* der Fall war, über hellem Sandgrund, besitzt er, von oben betrachtet, eine gute Tarnung.

Ein weiteres Problem, daß sich für eine Folgerung auf den ökologischen Nutzen der Schwammfarbe, wie Pawlik et al. (1995) sie gemacht haben ergibt, ist folgendes:

Nimmt man an, daß die auffällige Farbe mancher Schwämme eine Wirkung auf die Fische hat, die ihnen signalisiert, daß ein Fraßschutz vorhanden ist, und sie damit vom Fressen des Schwammes abhält, ist eine notwendige Bedingung, daß ein solcher Zusammenhang mit der Methode von Pawlik et al. (1995) experimentell überprüft werden kann, daß unauffällige Schwämme eine signifikant geringere mittlere Fraßhemmung besitzen. Doch zu den potentiellen Fraßfeinden der Schwämme zählen nicht nur Fische, sondern auch verschiedene Invertebraten, auf die die Farbe der Schwämme keinen Einfluß hat (Uriz et al. 1996, Thompson 1985). Schützen sich unauffällig gefärbte Schwämme in gleicher Weise wie auffällig gefärbte vor diesen Fraßfeinden und wirken die dazu eingesetzten Metaboliten sowohl auf Invertebraten als auch auf Fische fraßhemmend, kann dadurch der Unterschied zwischen der chemischen Fraßhemmung von auffälligen und unauffälligen Arten soweit verringert werden, daß er nicht mehr signifikant erkennbar ist.

Es bleibt die Frage, warum bei vergleichbarem chemischen Fraßschutz, für die eine Gruppe der Schwämme eine Tarnung sinnvoll ist, während sich die andere Gruppe ihre

Auffälligkeit als Schutz gegen die Fische zunutze macht. Hier wäre ein Zusammenhang mit der Wuchsform denkbar. Bei Betrachtung der von mir gesammelten Schwämme scheint ein Zusammenhang zwischen Wuchsform und Farbe möglich. Während die filigraneren Schwämme, die mit einer im Verhältnis zum Gesamtvolumen dünnen Basis am Untergrund befestigt sind, ausnahmslos gelb sind, besitzen die massigeren Schwammarten, die mit einem weit größeren Teil ihrer Oberfläche auf dem Substrat aufliegen, braune bis schwarze Färbung.

Es ist anzunehmen, daß filigrane Schwämme durch das bei Fischen beobachtete Trial&Error-Verhalten bei der Futtersuche (Bakus 1981) einen deutlich stärkeren Schaden nehmen würden, als massige Arten, von denen durch einen Fischbiß nur Teile der Oberfläche abgetrennt werden. Damit wäre es für filigrane Schwämme von Vorteil eine auffällige Signalfärbung zu besitzen, um ernsthafte Beschädigungen zu vermeiden. So könnten sie den Fischen schon vor dem Probieren signalisieren, daß ein Fraßschutz besteht. Massige Schwämme, die durch einen Biß des Fisches keinen ernsthaften Schaden nehmen, sind hingegen im Vorteil, wenn sie sich tarnen, um nicht die Aufmerksamkeit von Predatoren auf sich zu ziehen, die aufgrund einer eventuellen Nahrungsspezialisierung in der Lage sind, ihren Fraßschutz zu umgehen.

Natürlich basieren diese Überlegungen auf einer sehr kleinen Stichprobe und um fundierte Aussagen machen zu können, wären Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Wuchsform und Farbe von einer weit größeren Anzahl an Schwämmen notwendig. Dennoch, die Frage, ob die Farbe bei Schwämmen einem ökologischen Zweck dient, sei es zur Tarnung oder zur Abschreckung, bleibt offen.

DIE FRASSSCHUTZMETABOLITEN DES SCHWAMMES *APLYSINA CAVERNICOLA*

Die Biotransformation der Alkaloidvorstufen und ihr Einfluß auf den Fraßschutz des Schwammes

Durch die Anwendung von zwei verschiedenen Methoden zur Konservierung des Materials von *Aplysina cavernicola* standen mir für die Untersuchung an diesem Schwamm zwei Zustandsformen des Gewebes zur Verfügung. Extrakt 1 war aus dem gleich nach der Probenahme eingefrorenen und anschließend gefriergetrockneten Gewebe gewonnen worden. Er enthielt im wesentlichen Komponenten, die für unverletzte Zellen des Schwammes *Aplysina cavernicola* charakteristisch sind (Brenzinger 1996). Dagegen wurden in Extrakt 2, der aus dem ethanolkonservierten Schwamm gewonnen worden war, hauptsächlich Produkte der für die Familie der Aplysinidae beschriebenen verletzungsinduzierten Biotransformation der Sekundärmetaboliten aufgefunden (Teeyapant & Proksch 1993, siehe Einleitung 1.5.). Es ist also anzunehmen, daß die Konservierung durch Einfrieren des Schwammgewebes und das anschließende Gefriertrocknen der Probe zu einem Abstoppen der Enzymprozesse im Schwamm geführt hatten. Dagegen war es wohl unter dem Einfluß des Ethanol/Wasser-Gemisches während der Ethanolkonservierung zu der von Teeyapant & Proksch (1993) und Brenzinger (1996) beschriebenen Enzymreaktion gekommen. Vermutlich waren die Zellen durch das Konservierungsmittel Ethanol beschädigt worden, was zur Induzierung der Biotransformation geführt hat. Da das Ethanol in der eingesetzten Konzentration scheinbar nicht in der Lage war, die Enzyme des Schwammes zu Denaturieren, konnten die Transformationsprozesse ablaufen. Das im unverletzten Schwamm in großen Mengen vorkommende Aerothionin wurde somit ebenso wie die Metaboliten Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 enzymatisch zu Aeroplysinin-1 und in einem zweiten Schritt zu Dienon abgebaut, so daß Extrakt 2 im wesentlichen diesen Metaboliten aufwies.

Auch in Extrakt 1, der aus dem eingefrorenen Schwammstück gewonnen worden war, fanden sich Spuren von Dienon. Hier waren aber vermutlich nur periphere Schwammzellen durch die Bearbeitung verletzt worden, so daß sich nur geringe Mengen an Dienon gebildet hatten. Durch Kontakt des Schwammgewebes mit der Luft und Verwesungsprozesse, wäre die Beschädigung weiterer Zellen denkbar gewesen. Doch offensichtlich hat das Einfrieren des Gewebstückes die Enzymprozesse in den Zellen gestoppt, bevor größere Mengen des Aerothionins und der anderen Vorstufen in die Biotransformation eingehen konnten. Daß nur eine geringe Menge an Dienon aufgefunden wurde, läßt vermuten, daß sich die verletzungsinduzierte Enzymreaktion auf die beschädigten Zellen beschränkt. Käme es nach der Beschädigung des Schwammes *A.cavernicola* zu einer schnellen Ausbreitung der Enzymreaktion in seinem Gewebe, so wäre angesichts der relativ langen Bearbeitungszeit bis zum Einfrieren des Schwammes und der geringen Größe des bearbeiteten Schwammstückes ein erheblich höherer Gehalt des Dienons in Extrakt 1 zu erwarten gewesen.

Dadurch, daß die Biotransformation im eingefrorenen Schwammgewebe frühzeitig gestoppt worden war, war es möglich, den Gehalt des Aerothionins im nahezu unverletzten Schwamm zu bestimmen und in dieser Konzentration im Fütterungsversuch einzusetzen. Es zeigte sich eine stark fraßhemmende Wirkung auf die Versuchsfische. Ein ähnliches Ergebnis haben Thompson et al. (1985) in Fütterungsversuchen mit Aerothionin aus dem Schwamm *Aplysina fistularis* erhalten. Hier wirkte das Aerothionin auf die Versuchsfische *Carassius auratus* und *Clinocottus analis* stark fraßhemmend.

Dienon und Aeroplysinin-1 wurden in den Konzentrationen in die Futterstücke eingearbeitet, die im Extrakt des ethanolkonservierten Schwammes quantifiziert worden waren, um den Zustand im Schwammgewebe nach Beschädigung der Zellen zu simulieren. Keiner der beiden Metaboliten hatte in dieser Konzentration eine signifikant fraßhemmende Wirkung auf *Blennius sphinx*.

Dieses Ergebnis überrascht zunächst, denn es läßt schließen, daß es bei einer Verletzung des Schwammgewebes durch die Biotransformation des Aerothionins zu Dienon zu einer Verringerung des Fraßschutzes des Schwammes kommt. Doch stellt

sich die Frage, mit welchem Konzentrationsverhältnis zwischen den Produkten und Substraten der Biotransformation Fische, die den Schwamm fressen, tatsächlich konfrontiert sind. Ebel et al. (1997) beschreiben eine fast vollständige Umsetzung der Alkaloidvorstufen von *A.aerophoba* zu Dienon innerhalb von 40 Sekunden im lebenden Schwammgewebe. Nach Brenzinger (1996) verläuft die Biotransformation bei *A.cavernicola* etwas langsamer. Er untersuchte den Zeitverlauf der enzymatischen Abwehrreaktion dieses Schwammes unter *in vitro*-Bedingungen. Nach ca. 100 Sekunden war ein Maximum der Dienonkonzentration und ein Minimum der Alkaloidvorstufen Aerothionin, Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 erreicht. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß Fische das abgefressene Schwammstück für diese Dauer im Maul behalten. Hinzu kommt, daß, bis das Schwammmaterial den Magen erreicht, vermutlich nur ein Teil der Zellen durch das Fressen beschädigt wird, während der andere Teil unbeschädigt geschluckt wird und erst durch die Magensäure zersetzt wird. Hätte Dienon also eine stärker abschreckende Wirkung auf Fische als Aerothionin, so könnte das volle Ausmaß des Fraßschutzes erst nach dem Fressen des Schwammgewebes zum Tragen kommen, da erst dann die Biotransformation vollständig abgeschlossen ist. Wenn dies zu einer nachträglichen Schädigung des Fisches führen würde, könnte ein solcher Schutz zwar, wenn der Fisch lernen und in Zukunft diese Schwammart meiden würde, ihrer Erhaltung dienen, hätte aber für das gefressene Schwammindividuum keinen Nutzen mehr. Aus diesem Grund scheint eine Abschreckung von Fraßfeinden durch Aerothionin zweckmäßig.

Begünstigend auf diese Form des Fraßschutzes könnte außerdem eine ständige Abgabe von Aerothionin an die Umgebung wirken, wie sie für *Aplysina fistularis* festgestellt wurde (Thompson 1985). Walker et al. (1985) stellten fest, daß diese nach Verletzung des Schwammgewebes in ihrem Ausmaß zunimmt. Es wird damit wahrscheinlich, daß von einem abgebissenen Stück des Schwammes große Mengen an Aerothionin abgegeben werden, die direkt im Maul des Fraßfeindes ihre Wirksamkeit entfalten können. Daß dadurch ein sehr wirksamer Fraßschutz für das angegriffene Schwammindividuum entsteht, ist angesichts der ermittelten stark fraßhemmenden Wirkung des Aerothionins sehr wahrscheinlich.

Mit welcher Konzentration an Aeroplysinin-1 sind Fraßfeinde aber konfrontiert? Dieser Metabolit entsteht in der enzymatischen Biotransformation vor dem Dienon und kommt

somit mit den chemischen Sensoren im Maul der Fische wahrscheinlicher in Kontakt als dieses. Eingesetzt in der geringen Konzentration, die in Extrakt 2 quantifiziert wurde, hatte Aeroplysinin-1 in den Fütterungsversuchen keine fraßhemmende Wirkung auf *Blennius sphinx*. In Extrakt 1 konnte dieser Metabolit gar nicht detektiert werden. Anhand der geringen Aeroplysinin-1-Konzentrationen in den von mir hergestellten Extrakten hatte es also den Anschein, daß diese Zwischenstufe der Biotransformation so schnell zu Dienon weiterreagiert, daß die dabei entstehenden Konzentration keine Auswirkung auf das Freßverhalten der Fische haben können. Laut Brenzinger (1996) kommt es bei *A.cavernicola* jedoch noch bis fünf Minuten nach Start der Enzymreaktion zu einer Akkumulation des Aeroplysinin-1. Teeyapant (1994) stellte fest, daß die Reaktion von Aeroplysinin-1 zum Dienon, anders als die Reaktion vom Aerothionin zum Aeroplysinin-1, auch spontan, ohne den Einfluß von Enzymen stattfinden kann. Es ist also möglich, daß es während der Konservierung und Bearbeitung des Schwammmaterials zu einer Denaturierung der Enzyme und damit zu einer Hemmung des ersten Transformationsschrittes, der Entstehung von Aeroplysinin-1, gekommen ist. Da Aeroplysinin-1 aber auch ohne Enzymkatalyse zu Dienon transformiert werden kann, konnte dann wahrscheinlich, in der Zeit bis zur Analyse des Extraktes, das entstandene Aeroplysinin-1 weiterreagieren. Somit waren in meinen Extrakten keine, oder nur noch sehr geringe Mengen an Aeroplysinin-1 zu finden.

Um dennoch Informationen über den Beitrag des Aeroplysinin-1 zum Fraßschutz des Schwammes *A.cavernicola* zu erhalten, wurde dieser Metabolit in einem weiteren Fütterungsversuch in der molaren Konzentration, die für das Dienon im ethanolkonservierten Schwamm ermittelten worden war, eingesetzt. Damit entspricht die getestete Aeroplysinin-1-Konzentration einer theoretischen Konzentration zu einem Zeitpunkt, an dem sämtliche Vorstufen der Biotransformation nahezu vollständig umgesetzt worden sind, die Transformation des Aeroplysinin-1 zum Dienon aber noch nicht stattgefunden hat. In dieser Konzentration kann das Aeroplysinin-1 unter natürlichen Bedingungen nicht auftreten, da die Bildung des Dienons schon beginnt während die Reaktion der Alkaloidvorstufen zu Aeroplysinin-1 noch im Gange ist (Brenzinger 1996). Die Fraßhemmungsaktivität bei dieser Konzentration stellt aber die maximale fraßhemmende Wirkung des Aeroplysinin-1 in *A.cavernicola* dar, die

theoretisch, bei minimaler Geschwindigkeit der Reaktion von Aeroplysinin-1 zu Dienon, erreichbar wäre. Der Fütterungsversuch mit *Blennius sphinx* ergab für diese Konzentration eine fraßhemmende Wirkung, die etwas geringer ist als die des Aerothionins in der Konzentration im unverletzten Schwamm. Die maximal mögliche Fraßhemmungsaktivität des Aeroplysinin-1 bleibt damit also auf jeden Fall geringer, als die des Aerothionins, aus dem es entsteht. Damit ist die Erkenntnis, daß der Fraßschutz des Schwammes durch Verletzung des Gewebes und dem daraus resultierenden Abbau des Aerothionins verringert wird, unabhängig vom Konzentrationsverhältnis der entstehenden Metaboliten Dienon und Aeroplysinin-1. Was ist dann aber der ökologische Nutzen, den *A.cavernicola* aus der verletzungsinduzierten Enzymreaktion, die in seinem Gewebe stattfindet, zieht?

In der schon zuvor zitierten Arbeit von Thompson et al. (1985) wurde Aerothionin aus dem Schwamm *Aplysina fistularis* in verschiedenen Experimenten auf Bioaktivität getestet. Neben den Fütterungsversuchen mit Fischen, in denen es, wie erwähnt, starke Aktivität zeigte, wurden Tests zur wachstumshemmenden Wirkung auf marine Pilze und zur Entwicklungshemmung von Algen und den Larven verschiedener Meeresinvertebraten durchgeführt. In diesen Versuchen erwies sich das Aerothionin nur relativ schwach bioaktiv.

In der Arbeit von Debitus et al. (1998) wurden sowohl Aerothionin, als auch Aeroplysinin-1 und Dienon auf ihre antibakterielle Aktivität hin getestet. Während Aerothionin keine Wirkung zeigte, waren die beiden Produkte der Biotransformation gegenüber den getesteten Bakterien stark aktiv.

Eine ganze Reihe weiterer Untersuchungen bestätigt die biologische Aktivität von Aeroplysinin-1 und Dienon gegen verschiedene Arten von Mikroorganismen und mobile Fortpflanzungsstadien unterschiedlicher mariner Lebewesen (Teeyapant & Proksch 1993, Teeyapant et al. 1993, Weiss et al. 1996). Das Spektrum und das Ausmaß der Wirksamkeit dieser Substanzen gegen Fouling-Organismen ist dabei so groß, daß von Debitus et al. (1998) vorgeschlagen wird, sie als Antifouling-Mittel in der marinen Fischzucht einzusetzen.

Nach Verletzung des Schwammgewebes von *A.cavernicola* scheint es also durch die Biotransformation der Sekundärmetaboliten zu einem Infektionsschutz der entstandenen Wunde zu kommen:

Während die Ausgangsmetaboliten der Enzymreaktion dazu eingesetzt werden, die Beschädigung des Schwammes durch Fische als Fraßfeinde zu verhindern, hemmen die entstehenden Metaboliten, sollte es trotzdem zu einer Verletzung des Schwammgewebes kommen, das Wachstum und die Entwicklung von Mikroorganismen an der Wundfläche und verhindern außerdem die Ansiedlung von Larven und Sporen.

Die fraßhemmende Wirkung des Aerothionins wird unterstützt durch das Pigment des Schwammes, das sich in meinen Experimenten ebenfalls sehr wirksam gegen den Fraß durch *Blennius sphinx* erwies. Dieser Metabolit bildet vermutlich einen konstitutiven, also immerwährenden Schutz, der von den Vorgängen bei der verletzungsinduzierten Enzymreaktion sehr wahrscheinlich nicht beeinflusst wird.

Inwieweit weitere Metaboliten von *A.cavernicola* zu seinem Fraßschutz beitragen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Auch die Untersuchung synergistischer Effekte zwischen den Schwammetaboliten, die eine Fraßhemmungsaktivität bewirken können, welche über die Summe der Aktivitäten der einzelnen Metaboliten hinausgeht (Pawlik 1996), war bisher nicht Inhalt meiner Experimente. Im Anschluß an die Fertigstellung dieser Arbeit ist deshalb geplant, weiteres Material von *A.cavernicola* zu extrahieren, um solche Aspekte untersuchen zu können.

Der ökologische Nutzen des Dienons

Wie beschrieben kann die Reaktion von Aeroplysinin-1 zum Dienon spontan ablaufen (Teeyapant 1994). In Schwämmen der Familie Aplysinidae wird diese Reaktion aber zusätzlich enzymatisch katalysiert (Ebel et al. 1997). Es ist wahrscheinlich, daß der energetische Aufwand, den die Schwämme zur Produktion der dafür notwendigen Enzyme aufbringen müssen, durch einen ökologischen Nutzen dieser Reaktion gerechtfertigt ist. Vergleicht man aber die Bioaktivitäten der beiden Metaboliten, so stellt man fest, daß Aeroplysinin-1 dem Dienon im Ausmaß der Wirksamkeit gegen Mikroorganismen in vielerlei Hinsicht ähnlich und in einigen Fällen sogar überlegen ist (Weiss et al. 1996, Teeyapant et al. 1993, Debitus et al. 1998). Worin liegt dann aber der Nutzen der Entstehung des Dienons für den Schwamm?

Geht man davon aus, daß nicht sofort die gesamte Menge des entstandenen Aeroplysinin-1 zu Dienon weiterreagiert, was den Ergebnissen von Brenzinger (1996) entspricht, dann sind nach Verletzung des Schwammgewebes für eine gewisse Zeit beide Metaboliten gleichzeitig vorhanden. Da Aeroplysinin-1 und Dienon gegenüber verschiedenen Organismen unterschiedlich stark wirksam sind (Weiss et al. 1996, Teeyapant et al. 1993, Debitus et al. 1998), wäre deshalb durch den Besitz beider Substanzen ein größeres Wirksamkeitsspektrum abgedeckt als durch das Vorhandensein nur einer der beiden Substanzen. Der Schwamm würde also durch den gleichzeitigen Besitz beider Metaboliten besser vor dem Befall durch Mikroorganismen geschützt, als das für einen Metaboliten alleine der Fall wäre.

Ein weiterer Grund, der die Investition von Energie in die Umsetzung des Aeroplysinin-1 zu Dienon rechtfertigen könnte, wäre die Notwendigkeit zur Entsorgung der entstandenen Schutzmetaboliten. Während Aerothionin normalerweise in speziellen Speicherzellen, den sogenannten Spheroulous-Zellen des Schwammes eingelagert ist (Thompson et al. 1983) und nur kontrolliert an die Umgebung abgegeben wird (Walker et al. 1985), werden Aeroplysinin-1 und Dienon bei Verletzung teilweise in großen Mengen innerhalb der beschädigten Zellen freigesetzt. Bei längerer Einwirkungsdauer wäre es denkbar, daß in Nachbarschaft der Wundstelle liegende Schwammzellen durch die cytotoxische Wirkung dieser Metaboliten ebenfalls beschädigt werden. Es müßte dann also verhindert werden, daß diese Substanzen ihre Wirkung gegen den Schwamm selbst entfalten können.

Ein quantitativer Vergleich der Gehalte der bromierten Alkaloide in den beiden Extrakten von *A. cavernicola* wirft in diesem Zusammenhang einige Fragen auf: So könnten stöchiometrischen Gesichtspunkten entsprechend aus einem Molekül Aerothionin zwei Moleküle Aeroplysinin-1 entstehen, die dann wiederum zu zwei Molekülen Dienon reagieren können. Zu diesen aus Aerothionin entstandenen Aeroplysinin-1- und Dienonmolekülen kommen weitere hinzu, die aus der enzymatischen Umsetzung der Alkaloidvorstufen Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 stammen (Teeyapant & Proksch 1993, Brenzinger 1996). In der Summe müßte die Zahl der entstanden Aeroplysinin-1- und Dienonmoleküle also mehr als doppelt so groß sein, wie die Zahl der in die Biotransformation eingegangenen Aerothioninmoleküle. In

10ml des zur Konservierung eingefrorenen Gewebes (Gewebe 1) übersteigt der Gehalt des Aerothionins den Gehalt im gleichen Volumen ethanolkonservierten Schwammmaterials (Gewebe 2) um ca. 80 μmol . Extrakt 2 enthält jedoch pro 10ml Gewebe nur ca. 65 μmol Aeroplysinin-1- und Dienonmoleküle mehr als der Extrakt aus 10 ml Gewebe 1. Damit sind aus 80 μmol Aerothionin und einer unbekannten Anzahl an Aerophobin-2- und Aplysinamisin-1-Molekülen also nur 65 μmol Aeroplysinin-1 und Dienon entstanden. Die Menge an Aeroplysinin-1 und Dienon erreicht also bei weitem nicht den aufgrund stöchiometrischer Gesichtspunkte erwarteten Wert von über 160 μmol . Dies ist ein Phänomen, das auch in anderen Arbeiten beobachtet wurde (Ebel 1998, Brenzinger 1996).

Anzumerken ist an diesem Punkt, daß Unstimmigkeiten zwischen den Metabolitenkonzentrationen der beiden Extrakte auch durch die Bearbeitung der Gewebestücke verursacht sein können. So konnte, da das Volumen von Gewebe 1 nicht bekannt war (siehe 2.5.2.), für die Extraktion dieses Gewebes nicht die gleiche Lösungsmittelmenge pro Milliliter Schwammvolumen eingesetzt werden, wie für die Extraktion von Gewebe 2. Ein daraus resultierender Einfluß auf die Menge an extrahierten Metaboliten pro Volumen Schwammgewebe ist unwahrscheinlich, da in beiden Fällen sehr große Lösungsmittelvolumina verwendet und damit sehr wahrscheinlich beide Male erschöpfend extrahiert worden war. Doch wäre es möglich, daß durch den Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittelvolumina pro Milliliter Schwammgewebe, unterschiedliche Mengen an Salz aus den Geweben mitextrahiert wurden. Das Salz hätte damit an den beiden Extrakten unterschiedliche Anteile und könnte so, da das Volumen von Gewebe 1 aus dem Gewicht des aus ihm erhaltenen Extraktes errechnet wurde (siehe 2.5.1.), zu einer Fehleinschätzung seiner Metabolitenkonzentration bei der Quantifizierung geführt haben.

Nimmt man an, daß der Gehalt des Pigmentes im Schwamm durch die Biotransformation nicht beeinflusst wird, kann dieser Wert als Maß für die Beeinflussung der Quantifizierung durch den Salzgehalt in den Extrakten verwendet werden. Für Extrakt 1 ergibt sich ein geringerer Pigmentanteil, als für Extrakt 2. Dies bedeutet, daß es in Gewebe 1 vermutlich aufgrund eines höheren Salzgehaltes zu einer Unterschätzung der darin befindlichen Pigmentkonzentration kam. Damit wäre gleichzeitig auch der Gehalt der anderen Metaboliten in diesem Gewebe unterschätzt

worden. Das würde bedeuten, daß im unverletzten Schwammgewebe noch mehr Aerothionin enthalten ist, als im zur Konservierung eingefrorenen Schwammmaterial quantifiziert wurde. Daraus folgt einerseits, daß der Fraßschutz, der vom Aerothionin für den Schwamm ausgeht, durch die höhere Konzentration noch stärker wäre, als aus meinen Fütterungsversuchen hervorgeht. Andererseits würde es aber auch bedeuten, daß noch mehr Aerothioninmoleküle als zuvor beschrieben während der Biotransformation abgebaut wurden, die trotzdem in Extrakt 2 nicht als Dienon und Aeroplysinin-1 detektiert werden konnten. Wo geht diese große Zahl an Molekülen verloren?

Denkbar wäre, daß neben dem Aeroplysinin-1 und dem Dienon andere Metaboliten bei der Biotransformation der Alkaloidvorstufen entstehen, die mit den in meinen Untersuchungen angewendeten Methoden nicht detektiert werden konnten. Es wäre aber auch möglich, daß Dienon nicht das Endprodukt der Biotransformation ist, sondern zu einer anderen, nicht bioaktiven Substanz weiterreagiert. Auf diese Weise könnte der Schwamm seine bioaktiven Metaboliten entsorgen, bevor sie ihm selbst Schaden zufügen können. Vorstellbar wäre eine Resynthese der Alkaloidvorstufen unter Verwendung des Dienons. Damit könnte der Zustand vor der Verletzung des Gewebes wieder hergestellt werden, ohne daß die wertvollen Alkaloide dem Schwamm verloren gehen.

Weiterführende Fragestellungen zu den bromierten Alkaloiden der Schwammfamilie der Aplysinidae

Aus den Ergebnissen meiner Fütterungsversuche ergeben sich weitere Überlegungen, die das Vorkommen der von mir untersuchten Metaboliten aus *Aplysina cavernicola* in anderen Meeresorganismen betreffen.

So findet in den Zellen des mit *Aplysina cavernicola* eng verwandten Schwammes *Aplysina aerophoba* eine sehr ähnliche Biotransformation der bromierten Alkaloide statt (Teeyapant & Proksch 1993, siehe Einleitung 1.5.). Aerophobin-2 und Aplysinamisin-1 sind in den Schwämmen beider Arten vorhanden, jedoch geht bei *A.aerophoba*, statt des Aerothionins, das bei *A.cavernicola* als Substrat dient, Isofistularin-3 in die Biotransformation ein. Aerothionin wurde bisher noch nicht in Schwämmen der Spezies

A.aerophoba gefunden (Teeyapant & Proksch 1993, Ciminello et al. 1997, Ebel et al. 1999).

Wie beschrieben trägt Aerothionin wesentlich zum Fraßschutz von *A.cavernicola* bei. Fütterungsversuche mit der tropischen Fischart *Thalassoma bifasciatum* haben dagegen ergeben, daß die Alkaloidvorstufen aus dem Extrakt von *A.aerophoba*, eine schwächere fraßhemmende Wirkung besitzen, als ein in den gleichen Experimenten verwendetes Gemisch aus Aeroplysinin-1 und Dienon (Ebel et al. 1997). Da sich für Aerothionin in meinen Experimenten eine stärkere Fraßhemmungsaktivität als für Aeroplysinin-1 und Dienon zeigte, ergibt sich daraus ein geringerer Fraßschutz des Schwammes *A.aerophoba* durch seine bromierten Alkaloide, als das für *A.cavernicola* der Fall ist.

Ergänzt wird der Fraßschutz von *A.cavernicola* durch sein Pigment, die 4-Dihydroxyquinolin-2-carboxylsäure. Uranidin, das Pigment des Schwammes *A.aerophoba*, hat eine ähnliche Grundstruktur, ist jedoch anders substituiert (Cimino et al. 1984). Unter Wasser ist *A.aerophoba* durch dieses Pigment ebenfalls gelb gefärbt, doch bei Kontakt mit Luft färbt sich der Schwamm sehr schnell schwarz (Teeyapant 1994). Durch diese bei der Bearbeitung von *A.cavernicola* nahezu unvermeidbare Reaktion ist die Untersuchung des Uranidins in seiner ursprünglichen Form in Fütterungsexperimenten nur sehr schwer durchführbar. Bisher gibt es deshalb keine Erkenntnisse zur fraßhemmenden Wirkung dieses Metaboliten.

Im Anbetracht der Tatsache, daß in den Untersuchungen zur fraßhemmenden Aktivität der verschiedenen Aplysina-Metaboliten unterschiedliche Fischarten aus unterschiedlichen Ökosystemen verwendet wurden, ist ein derartiger Vergleich der Daten nur begrenzt aussagekräftig (siehe oben). Dennoch, anders als bei *A.cavernicola*, können bisher keine sicheren Aussagen darüber gemacht werden, wie sich der Schwamm *A.aerophoba* vor Fraß durch Fische schützt. Untersuchungen hierzu sind im Anschluß an die Fertigstellung dieser Arbeit geplant.

Ein weiterer mariner Organismus, der nicht dem Stamm der Porifera angehört, besitzt einen hohen Anteil der für die Aplysinidae typischen bromierten Alkaloide im Gewebe. Es handelt sich um die Nacktschnecke *Tylodina perversa*, die vielfach auf Individuen

von *A.aerophoba* gefunden wird. Sie ist in der Lage, Gewebe von Aplysinidae-Schwämmen zu fressen und die bromierten Alkaloide, die sie über die Nahrung aufnimmt, in ihren eigenen Körper einzulagern (Teeyapant et al. 1993).

Ebel et al. (1999) untersuchten die Verteilung dieser Alkaloide in den Organen von sieben Schnecken der Spezies *Tyrodina perversa*, die an der Küste von L'Estartit in Spanien gesammelt wurden. Man hatte die Tiere von Individuen des Schwammes *Aplysina aerophoba* abgesammelt und anschließend für sieben Tage in Aquarien gehalten, wo sie sich ausschließlich von diesem Schwamm ernähren konnten. Die Untersuchungen ergaben eine besonders hohe Konzentration der bromierten Alkaloide im Mantel der Tiere. Auch in anderen Organen wie dem Verdauungstrakt, den Fortpflanzungsorganen und auch in den Eiern, dem Kot und dem Schleim der Schnecken wurden die Schwammalkaloide gefunden.

Mehrere Arbeiten hatten schon früher gezeigt, daß sich verschiedene Vertreter der morphologisch ungeschützten Nudibranchia mit Hilfe fraßhemmender Substanzen aus Schwämmen vor ihren Fraßfeinden schützen (Pawlik et al. 1988, Faulkner & Ghiselin 1983, Marin et al. 1997). Aus der selektiven Einlagerung der Schwammalkaloide in die verschiedenen Gewebsteile der Schnecke wurde deshalb auch in der Arbeit von Ebel et al. (1999) auf deren Verwendung als Fraßschutz geschlossen.

Interessanterweise fand sich in den Schnecken, neben den für *Aplysina aerophoba* typischen Alkaloiden auch das Aerothionin des Schwammes *A.cavernicola*. Vor allem in Mantel und Schleim kommt es in hohen Konzentrationen vor. Unklar ist der Ursprung dieser Substanz. Wahrscheinlich scheint, daß die Schnecken vor der Probenahme auch von *A.cavernicola* gefressen haben. Hesbacher et al. (1995) konnten zeigen, daß mit der Nahrung aufgenommene Metaboliten noch bis zu vier Wochen im Schneckengewebe nachweisbar sind. Es wäre also denkbar, daß sich noch Rückstände der Metaboliten dieses Schwammes im Gewebe befanden, obwohl die Schnecken im Verlauf von mindestens einer Woche ausschließlich *A.aerophoba* gefressen hatten. Zweifel an dieser Annahme kommen angesichts des seltenen Vorkommens von *A.cavernicola* am Ort der Probenahmen auf. Trotzdem hatten alle untersuchten Individuen Anteile des Metaboliten dieses Schwammes im Gewebe, dessen Konzentrationen sich unter den Schnecken nur sehr geringfügig unterschieden (Ebel et al. 1999). Hinzu kommt, daß Teeyapant et al. (1993) an vor den Kanarischen Inseln

gesammelten Individuen von *Tylodina perversa* ganz ähnliche Beobachtungen gemacht haben. Auch hier wurden die Schnecken von Individuen des Schwammes *A.aerophoba* abgesammelt und es wurden hohe Konzentrationen von Aerothionin in ihren Geweben gefunden, obwohl der während der Probenahme gefressene Schwamm diesen Metaboliten nicht enthält.

Eventuell können durch eine weitere Substanz, die von Teeyapant (1994) im Extrakt von *T.perversa* entdeckt wurde, weitere Indizien gefunden werden, die bei der Klärung der Frage nach dem Ursprung des Aerothionins in den Schnecken hilfreich sein können. Teeyapant (1994) vermutete, daß es sich bei dieser Substanz um einen dem Uranidin von *A.aerophoba* ähnlichen Metaboliten handelt. Die Struktur der Substanz wurde aber nicht aufgeklärt. Sollte es hierbei um das in *A.cavernicola* gefundene Pigment handeln, so wäre dies ein recht deutlicher Hinweis darauf, daß die Schnecken neben *A.aerophoba* auch diesen Schwamm gefressen haben. Ein Vergleich der von Teeyapant (1994) gefundenen Substanz mit dem in meiner Arbeit isolierten Pigment von *A.cavernicola* soll im Anschluß an die Fertigstellung dieser Arbeit erfolgen.

Doch unabhängig von der Antwort auf die Frage nach der Herkunft des Aerothionins in *T.perversa*, scheint es durch die selektive Einlagerung dieses Metaboliten in den Mantel und den Schleim der Schnecken wahrscheinlich, daß sie als Fraßschutz das Aerothionin den anderen bromierten Alkaloiden, die sie durch das Fressen von Aplysiniidae-Schwämmen aufnimmt, vorzieht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen meiner Fütterungsversuche, in denen das Aerothionin eine sehr starke Fraßhemmungsaktivität aufwies.

5. Literaturverzeichnis

Acosta, A. L. und Rodriguez, A. D. (1992): 11-Oxo-aerothionin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*.

J. Nat. Prod. Lloydia., **55** (7) : 1007-1012

Althoff, K.; Schütt, C.; Steffen, R.; Batel, R. und Müller, W. E. G. (1998): Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria ?

Mar.Biol., **130** : 529-536

Arillo, A.; Bavestrello, G.; Burlando, B. und Sara, M. (1993): Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges: A possible mechanism.

Mar.Biol., **117** (1) : 159-162

Bailey, J. A. und Mansfield, J. W. (1982): Phytoalexins.

Blackie, Glasgow

Bakus, G. J. und Green, G. (1974): Toxicity in sponges and holothurians: a geographic pattern.

Science, **185** : 951-953

Bakus, G. J. (1981): Chemical defense mechanisms on the Great Barrier Reef, Australia.

Science, **211** : 497-498

Bakus, G. J.; Targett, N. M. und Schulte, B. (1986): Chemical ecology of marine organisms: An overview.

J.Chem.Ecol., **12** : 951-987

Bakus, G. J.; Wright, M.; Khan, A. K.; Ormsby, B.; Gulko, D. A.; Licuanan, W.; Carriazo, E.; Ortiz, A. und Chan, D. B. (1994): Experiments seeking marine natural antifouling compounds.

In: M. F. Thompson (Hrsg.): Recent developments in biofouling control.

Barthel, D. und Gutt, J. (1992): Sponge associations in the eastern Wedell Sea.

Antarctic Science, **4** : 137-150

Bavestrello, G.; Arillo, A.; Benatti, U.; Cerrano, C.; Cattaneo-Vietti, R.; Cortesogno, L.; Gaggero, L.; Giovine, M.; Tonetti, M. und Sara, M. (1995): Quartz dissolution by the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae).

Nature, **378** (6555) : 374-376

Bavestrello, G.; Cerrano, C.; Cattaneo-Vietti, R.; Sara, M.; Calabria, F. und Cortesogno, L. (1996): Selective incorporation of foreign material in *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae).

Ital.J.Zool., **63** (3) : 215-220

Becerro, M. A.; Turon, X.; Uriz, M. J. und Lopez, N. I. (1994): Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges.

J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **179** : 195-205

Becerro, M. A.; Turon, X. und Uriz, M. J. (1995): Natural variation of toxicity in encrusting sponge *Crambe crambe* (Schmidt) in relation to size and environment. *J.Chem.Ecol.*, **21** (12) : 1931-1946

Becerro, M. A.; Turon, X. und Uriz, M. J. (1997a): Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *J.Chem.Ecol.*, **23** (6) : 1527-1547

Becerro, M. A.; Uriz, M. J. und Turon, X. (1997b): Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). *Hydrobiologia*, **355** (1-3) : 77-89

Bergquist, P. R. und Bedford, J. J. (1978): The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae; systematic and geographical considerations. *Mar.Biol.*, **46** : 215-221

Betancourt-Lozano, M.; Gonzalez-Farias, F.; Gonzalez-Acosta, B.; García-Gasca, A. und Bastida-Zavala, J. R. (1998): Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*, **223** (1) : 1-18

Bewley, C. A.; Holland, N. D. und Faulkner, D. J. (1996): Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, **52** (7) : 716-722

bmb+f (1997): Marine Naturstoffforschung - Konzept zur Schwerpunktförderung. Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Braekman, J. C. und Daloz, D. (1986): Chemical defence in sponges. *Pure & Appl.Chem.*, **58** : 357-364

Brauers, G. (1998): Sekundäre Inhaltsstoffe schwamm-assoziiierter Pilze. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Brenzinger, M. (1996): Bromierte Alkaloide aus Verongia-Arten: Isolierung, Identifizierung und enzymatische Umsetzung. Diplomarbeit, Universität Würzburg

Bryant, J. P.; Chapin, F. S. und Klein, D. R. (1983): Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, **40** : 357-368

Carney, J. R. und Rinehart, K. L. (1995): Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *J. Nat. Prod.*, **58** (7) : 971-985

Carpenter, R. C. (1986): Partitioning herbivory and its effects on coral algal communities.
Ecol.Monogr., **56** : 345-365

Carté, B. K. (1996): Biomedical Potential of Marine Natural Products.
BioScience, **46** (No. 4) : 271-286

Cattaneo-Vietti, R.; Angelini, S.; Bavestrello, G. und Giannuzzi-Savelli, R. (1993): Skin and gut spicules in *Discodoris atromaculata* (Bergh, 1880) (Mollusca: Nudibranchia).
Boll.Malacol., **29** (5-8) : 173-180

Chanas, B. und Pawlik, J. R. (1995): Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. 2. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality.
Mar.Ecol.Prog.Ser., **127** (1-3) : 195-211

Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T. und Fenical, W. (1996): Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt).
J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **208** (1-2) : 185-196

Ciminello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S. und Pansini, M. (1996): Chemistry of verongida sponges. VI. Comparison of the secondary metabolic composition of *Aplysina insularis* and *Aplysina fulva*.
Biochem. Syst. Ecol., **24** (2) : 105-113

Ciminello, P.; Fattorusso, E.; Foriono, M.; Magno, S. und Pansini, M. (1997): Chemistry of Verongida Sponges VIII -Bromocompounds from the Mediterranean Sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*.
Tetrahedron, **53** : 6565-6572

Cimino, G.; de Rosa, S.; de Stefano, S.; Spinella, A. und Sodano, G. (1984): The zoochrome of the sponge *Verongia aerophoba* ("Uranidine").
Tetrahedron Letters, **25** (27) : 2925-2928

Correa, J. A. und Sanchez, P. A. (1996): Ecological aspects of algal infectious diseases.
Hydrobiologia, **326/327** : 89-96

Crisp, D. J. und Ryland, J. S. (1960): Influence of filming and of surface texture on the settlement of marine organisms.
Nature, **185** : 119

Cronin, G.; Paul, V. J.; Hay, M. E. und Fenical, W. (1997): Are tropical herbivores more resistant than temperate herbivores to seaweed chemical defenses? Diterpenoid metabolites from *Dictyota acutiloba* as feeding deterrents for tropical versus temperate fishes and urchins.
J. Chem. Ecol., **23** (2) : 289-302

- Cruz, F.; Quijano, L.; Gomez Garibay, F. und Rios, T. (1990): Brominated metabolites from the sponge *Aplysina (verongia) thiona*.
J. Nat. Prod. Lloydia., **53** (3) : 543-548
- Dayton, P. K.; Robilliard, G. A.; Paine, R. T. und Dayton, L. B. (1974): Biological accomodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antactrica.
Ecol. Monogr., **44** : 105-128
- Debitus, C.; Guella, G.; Mancini, I.; Waikedre, J.; Guemas, J.-P.; Nicolas, J.-L. und Pietra, F. (1998): Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea.
J Mar Biotechnol., **6** : 136-141
- Duffy, J. E. und Paul, V. J. (1992): Prey nutritional quality and the effectiveness of chemical defenses against tropical reef fishes.
Oecologia, **90** (3) : 333-339
- Ebel, R.; Brenzinger, M.; Kunze, A.; Gross, H. J. und Proksch, P. (1997): Wound Activation of Protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*.
J.Chem.Ecol., **23** (No.5) : 1451-1462
- Ebel, R.; Marin, A. und Proksch, P. (1999): Organic-specific distribution of dietary alkaloids in the marine opisthobranch *Tylodina perversa*.
Biochemical Systematics and Ecology, **27** : 769-777
- Escalona de Motta, G.; Rosa, R.; Rodriguez, A. D. und Morales, J. J. (1991): Effect of alkaloids from tropical marine sponges on muscle membrane excitability.
Am. Zool., **31** (5) : 31A
- Fattorusso, L. M. und Sodano, G. (1972): Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*.
J.Chem.Soc.Perkin Trans., **1** : 16-18
- Faulkner, D. J. und Ghiselin, M. T. (1983): Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods.
Mar.Ecol, Prog. Ser., **13** : 295-301
- Faulkner, D. J. (1997): Marine natural products.
Nat..Prod.Rep., **9** : 323-539
- Feeny, P. (1976): Plant apparency and chemical defense.
Recent Adv.Phytochem., **10** : 1-40
- Friedrich, A. (1998): Bakterien des Schwammes *Aplysina cavernicola*: Detektion, Charakterisierung und phylogenetische Einordnung.
Diplomarbeit, Universität Würzburg

Goodbody, I. (1961): Inhibition of development of a marine sessile community.
Nature.Lond., **190** : 282-283

Green, G. (1977a): Antibiosis in marine sponges.
FAO Fisheries Report, **200** : 199-205

Green, G. (1977b): Ecology of toxicity in marine sponges.
Mar.Biol., **40** : 207-215

Grigg, G. W.; Polovina, J. J. und Atkinson, M. J. (1984): Model of a coral reef ecosystem. III. Resource limitation, community regulation, fisheries yield, and resource management.
Coral Reefs, **3** : 23-27

Hesbacher, S.; Baur, B.; Baur, A. und Proksch, P. (1995): Sequestration of lichen compounds by three species of terrestrial snails.
J. Chem. Ecol., **23** : 233-246

Huston, M. A. (1985): Patterns of species diversity on coral reefs.
A Rev.Ecol.Syst., **16** : 149-177

Jackson, J. B. C. und Buss, L. (1975): Allelopathy and spatial competition among coral reef invertebrates.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **72** : 5160-5163

Joffe, S. und Thomas, R. (1989): Phytochemicals: a renewable global resource.
Ag.Biotech. News Information, **1** : 697-700

Jones, D. A. (1988): Cyanogenesis in animal-plant interactions.
In: D. Evered and S. Harnett (Hrsg.): Cyanide compounds in biology. John Wiley, Chichester

Kernan, M. R.; Molinski, T. F. und Faulkner, D. J. (1988): Macrocyclic antifungal metabolites from the Spanish dancer nudibranch *Hexabranchnus sanguineus* and sponges of the genus *Halichondria*.
J.Org.Chem., **53** : 5014-5020

Kodama, M.; Ogata, T. und Sato, S. (1988): Bacterial production of saxitoxin.
Agric. Biol.Chem., **52** : 1075

Köhler, W.; Schachtel, G. und Voleske, P. (1995): Biostatistik: Einführung in die Biometrie für Biologen.
Springer Verlag, Berlin

Lalli, C. M. und Parsons, T. R. (1997): Biological oceanography: an introduction.
Butterworth-Heinemann, Linacre House, Jordan Hill, Oxford

Lappin-Scott, H. M. und Costerton, J. W. (1989): Bacterial biofilms and surface fouling.
Biofouling, **1** : 323-342

Lewin, R. (1984): Microbial adhesion, a sticky problem.
Science, **224** : 375-377

Marin, A.; Lopez-Belluga, M. D.; Scognamiglio, G. und Cimino, G. (1997): Morphological and Chemical Camouflage of the Mediterranean Nudibranch *Discodoris indecora* on the Sponges *Ircinia variabilis* and *Ircinia fasciculata*.
J.Molluscan Stud., **63** (3) : 431-439

Martín, D. und Uriz, M. J. (1993): Chemical bioactivity of Mediterranean benthic organisms against embryos and larvae of marine invertebrates.
J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **173** (1) : 11-27

McCaffrey, E. J. und Endean, R. (1985): Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges.
Mar.Biol., **89** : 1-8

McClintock, J. B. (1987): Investigation of the relationship between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, spicule armament and toxicity of benthic sponges at McMurdo Sound, Antarctica.
Mar.Biol., **94** : 479-487

McClintock, J. B.; Swenson, D.; Trapido-Rosenthal, H. und Banghart, L. (1997): Ichthyodeterrent properties of lipophilic extracts from Bermudian sponges.
J.Chem.Ecol., **23** (6) : 1607-1620

McKey, D. (1974): Adaptive patterns in alkaloid physiology.
American Naturalist, **108** : 305-320

McKey, D. (1979): The distribution of secondary compounds within plants.
In: G. A. Rosenthal and D. H. Janzen (Hrsg.): Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. Academic Press, New York

Mebs, D. (1989): Gifte im Riff.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Meylan, A. (1988): Spongivory in hawksbill turtles: a diet of glass.
Science, **239** : 393-395

Müller, W. E. G. und Schröder, H. C. (1997): Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln.
Biologie in unserer Zeit, **27** : 389-398

Munro, M. H. G.; Luibrand, R. T. und Blunt, J. W. (1987): The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms.
In: P. S. Scheuer (Hrsg.): Bioorganic Marine Chemistry. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Neeman, I.; Fishelson, L. und Kashman, Y. (1975): Isolation of a new toxin from the sponge *Latrunculia magnifica* in the gulf of Aquaba (Red Sea).
Mar.Biol., **30** : 293-296

Ott, J. (1996): Meereskunde: Einführung in die Geographie und Biologie der Ozeane.
Ulmer Verlag, Stuttgart

Paul, V. J. (1992): Chemical defense of benthic marine invertebrates.
In: V. J. Paul (Hrsg.): Ecological roles of marine natural products. Cornell University Press (Comstock), Ithaca, NY

Pawlik, J. R.; Kernan, M. R.; Molinski, T. F.; Harper, M. K. und Faulkner, D. J. (1988): Defensive chemicals of the Spanish dancer nudibranch *Hexabranhus sanguineus* and its egg ribbons: Macrolides derived from a sponge diet.
J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **119** : 99-109

Pawlik, J. R. (1983): A sponge-eating worm from Bermuda: *Branchiosyllis oculata* (Polychaeta, Syllidae).
PSZN I: Mar.Ecol., **4** : 65-79

Pawlik, J. R.; Chanas, B.; Toonen, R. J. und Fenical, W. (1995): Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence.
Mar.Ecol.Prog.Ser., **127** : 183-194

Pawlik, J. (1996): Synergistic chemical defenses of the Caribbean sponges *Aplysina archeri* and *A. cauliformia*.
Twenty Fourth Annual Benthic Ecology Meeting, Held In Columbia, South Carolina, March, (D) : 65

Pennings, S. C.; Pablo, S. R.; Paul, V. J. und Duffy, J. E. (1994): Effects of sponge secondary metabolites in different diets on feeding by three groups of consumers.
J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **180** : 137-149

Porter, J. W. und Targett, N. M. (1988): Allelochemical interactions between sponges and corals.
Biol.Bull., **175** : 230-239

Proksch, P. (1994a): Biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen.
Durch natürliche Selektion zur pharmazeutischen Leitstruktur.
Deutsche Apotheker Zeitung, 134.Jahrg. Nr.51/52 : 19-34

Proksch, P. (1994b): Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranches.
Toxicon, **32** (No.6) : 639-655

Proksch, P. und Ebel, R. (1998): Ecological significance of alkaloids from marine invertebrates.
In: M. F. Roberts und M. Wink (Hrsg.): Plant alkaloids: biochemistry, ecology and medical applications. Plenum Publishing Corporation, New York

Randall, J. E. und Hartmann, W. D. (1968): Sponge-feeding fishes of the West Indies.
Mar.Biol., **1** : 216-225

Reiswig, H. M. (1973): Population dynamics of three Jamaican Demospongiae.
Bull.mar.Sci., **23** : 191-226

Reiswig, H. M. (1974): Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges.
J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **14** : 231-249

Reiswig, H. M. (1981): Partial carbon and energy budgets of the bacteriosponge *Verongia fistularis* in Barbados.
Mar.Ecol., **2** : 273-293

Rhoades, D. F. und Cates, R. G. (1976): Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry.
Recent Adv.Phytochem., **10** : 168-213

Rützler, K. (1978): Sponges in coral reefs.
In: D. R. Stoddart und R. E. Johannes (Hrsg.): Coral reefs: research methods. Monographs on oceanographic methodology. UNESCO, Paris

Rützler, K. (1981): An unusual bluegreen alga symbiotic with two new species of *Ulosa* (Porifera: Hymeniavidonidae) from Carrie Bow Cay, Belize.
Mar.Ecol., **2** : 35-50

Scheuer, P. J. (1978-1983): Marine natural products: chemical and biological perspectives.
Academic Press, New York

Schmahl, G. P. (1991): Community structure and ecology of sponges associated with four southern Florida coral reefs.
In: K. Rützler (Hrsg.): New perspectives in sponge biology. Smithsonian Inst. Press, Washington, DC

Schubauer, J. P.; Burns, T. P. und Richardson, T. H. (1991): Population dynamics of five demospongiae in Jamaica: variation in time and space.
In: K. Rützler (Hrsg.): New perspectives in sponge biology. Smithsonian Inst Press, Washington, DC

Schupp, P.; Eder, C.; Paul, V. und Proksch, P. (1999): Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its ecological implications.
Mar.Biol., **135** (4) : 573-580

Schupp,P. (2000): Structure Elucidation, Biological Activity and Ecology of Secondary Metabolites from Micronesian Marine Invertebrates.
Dissertation, Universität Würzburg

Shimizu, Y. (1987): Dinoflagellate toxins.
In: (Hrsg.): The biology of dinoflagellates. Blackwell Sci.Publ., Oxford

Stahl (1904): Die Schutzmittel der Flechten gegen Tierfraß.
In: (Hrsg.): Festschrift zum 70. Geburtstag von Ernst Haeckel. G. Fischer Verlag, Jena

Steidinger, K. A. und Baden, D. G. (1984): Toxic marine dinoflagellates.
In: D. L. Spector (Hrsg.): Dinoflagellates. Academic Press, Orlando

Suchanek, T. H.; Carpenter, R. C.; Witman, J. D. und Harvell, C. D. (1985): Sponges as important space competitors in deep Caribbean coral reef communities.
In: M. L. Reaka (Hrsg.): The ecology of deep and shallow coral reefs. Symposia series for undersea research 3(1). NOAA/NURP, Rockville, MD

Sullivan, B.; Faulkner, D. J. und Webb, L. (1983): Siphonodictidine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon* sp. that inhibits coral growth.
Science, **221** : 1175-1176

Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; van Engen, D.; Clardy, J.; Gopichand, Y. und Schmitz, F. J. (1981): Okadaic Acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*.
J.Am.Chem.Soc., **103** : 2469-2471

Targett, N. M. und Schmahl, G. P. (1984): Chemical ecology and distribution of sponges in the Salt River Canyon, St.Croix.
U.S.I.V. NOAA Tech.Mem. OAR NURP-1, Rockville, MD

Teeyapant, R. und Proksch, P. (1993): Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba*. Evidence for an induced chemical defense ?
Naturwiss., **80** : 369-370

Teeyapant, R.; Woerdenbag, H. J.; Kreis, P.; Hacker, J.; Wray, V.; Witte, L. und Proksch, P. (1993): Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*.
Z.Naturforsch., **48c** : 939-945

Teeyapant, R. (1994): Brominated Secondary Metabolites of the Marine Sponge *Verongia aerophoba* Schmidt and the Sponge Feeding Gastropod *Tyrodina perversa* Gmelin: Identification, Biological Activities and Biotransformation.
Dissertation, Universität Würzburg

Thacker, R. W.; Becerro, M. A.; Lumbang, W. A. und Paul, V. J. (1998): Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef.
Ecology, **79** (5) : 1740-1750

Thompson, T. E. (1976): Nudibranchs.
THF Publications, Neptune City, NJ

Thompson, J. E.; Barrow, K. D. und Faulkner, D. J. (1983): Localization of two brominated metabolites, aerothionin and homoaerothionin , in speroulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis*.
Act.zool.Stockh., **64** : 199-210

Thompson, J. E.; Walker, N. D. und Faulkner, D. J. (1985): Screening and bioassays for biologically active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA.
Mar.Biol., **88** : 11-21

Thompson, J. E. (1985): Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence.
Mar.Biol., **88** : 23-26

Towne, V. und Pawlik, J. (1996): Chemical defenses of benthic invertebrates inhabiting the coastal waters of North Carolina.
In: S. A. Woodin, D. M. Allen, S. E. Stancyk, J. Williams-Howze, R. J. Feller, D. S. Wethey, N. D. Pentcheff, G. T. Chandler, A. W. Decho und B. C. Coull (Hrsg.): Twenty-fourth annual benthic ecology meeting. Columbia, South Carolina

Turon, X.; Becerro, M. A. und Uriz, M. J. (1996a): Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates: The encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida).
Oikos, **75** (1) : 33-40

Turon, X.; Becerro, M. A.; Uriz, M. J. und Llopis, J. (1996b): Small-scale association measures in epibenthic communities as a clue for allelochemical interactions.
Oecologia, **108** (2) : 351-360

Unson, M. D. und Faulkner, D. J. (1993): Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera).
Experientia, **49** (4) : 349-353

Uriz, M. J.; Martin, D.; Turon, X.; Ballesteros, E.; Hughes, R. und Acebal, C. (1991): An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities.
Mar.Ecol.Prog.Ser., **70** (2) : 175-188

Uriz, M. J.; Martin, D. und Rosell, D. (1992): Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean littoral sponges.

Mar.Biol., **113** (2) : 287-297

Uriz, M. J.; Turon, X.; Becerro, M. A. und Galera, J. (1996): Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage.

J.Exp.Mar.Biol.Ecol., **205** (1-2) : 187-204

Vacelet, J. (1975): Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée chroococciale et une éponge du genre *Verongia*.

J.Microscopie, **12** : 363-380

vanSoest, R. (1996): Porifera, Schwämme.

In: W. Westheide und R. Rieger (Hrsg.): Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Vermeij, G. J. (1978): Biogeography und Adaption Patterns of Marine Life.

Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Vogel, S. (1977): Current-induced flow through living sponges in nature.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **74** : 2069-2071

Waddell, B. und Pawlik, J. R. (2000): Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. I. Assays with hermit crabs.

Mar.Ecol.Prog.Ser., **125** : 125-132

Walker, R. P.; Thompson, J. E. und Faulkner, D. J. (1985): Exudation of biologically active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence.

Mar.Biol., **88** : 27-32

Weiss, B. (1995): Inhaltsstoffe des Schwammes *Verongia aerophoba*: "Untersuchungen zur Biotransformation und biologischen Aktivität".

Diplomarbeit, Universität Würzburg

Weiss, B.; Ebel, R.; Elbrächter, M.; Kirchner, M. und Proksch, P. (1996): Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*.

Biochem.Syst.Ecol., **24** : 1-12

Wenner, E. L.; Knott, D. M.; vanDolah, R. F. und Burrell, V. G. (1983): Invertebrate communities associated with hard bottom habitats in the South Atlantic Bight.

Estuar.coas.Shelf Sci., **17** : 143-158

Wilkinson, C. R. (1983): Net primary productivity in coral reef sponges.

Science, **219** : 410-411

Wulff, J. L. (1994): Sponge feeding by Caribbean angelfishes, trunkfish and filefishes.

In: R. W. M. VanSoest, T. M. G. VanKempgen und J. C. Braekman (Hrsg.): Sponges in time und space. Balkema, Rotterdam

Zusammenfassung

Schwämme haben in den über 600 Millionen Jahren ihrer Entwicklung alle aquatische Lebensräume besiedelt und sich dabei in unterschiedlichster Weise an ihre Umgebung angepaßt. Aus biologischer und pharmazeutischer Sicht sind hierbei besonders die Anpassungen, die sich in ihrem Sekundärmetabolismus vollzogen haben, interessant. So haben die Schwämme, als sessile und morphologisch nur wenig geschützte Besiedler des Benthals, verschiedenste chemische Waffen in Form von Sekundärmetaboliten entwickelt. Mit diesen sind sie in der Lage, sich im Überlebenskampf gegen ihre Konkurrenten und Fraßfeinde erfolgreich zur Wehr zu setzen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß von Schwammetaboliten auf das Fraßverhalten von potentiellen Predatoren. Als Testorganismus diente *Blennius sphinx*, ein bodenlebender Fisch, der im oberen Litoral des Mittelmeeres beheimatet ist.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Extrakte von zehn mediterranen Schwämmen in Fütterungsversuchen auf ihre fraßhemmende Wirkung getestet.

Sieben der zehn getesteten Schwammextrakte zeigten eine signifikant fraßhemmende Aktivität gegenüber *Blennius sphinx*. Anhand von Beobachtungen, die bei der Probenahme an den Schwämmen und ihrer Umgebung gemacht worden waren, und Messungen ihres Stickstoffgehaltes werden mögliche Zusammenhänge zwischen dem Auftreten eines ausgeprägten chemischen Fraßschutzes und dem Einfluß ökologischer Faktoren diskutiert.

Der zweite Teil meiner Experimente diente der Isolierung und Identifizierung der Fraßschutzsubstanzen des Schwammes *Aplysina cavernicola*.

In Schwämmen der Familie der Aplysinidae findet bei Verletzung des Gewebes eine Enzymreaktion statt, die zu einer Biotransformation verschiedener Komponenten des Schwammes führt (Teeyapant & Proksch 1993). Auch bei Beschädigung der Zellen von *A.cavernicola* findet diese enzymatische Umwandlung statt (Brenzinger 1996).

Für die vorliegende Arbeit wurden sowohl die Substrate vor Beginn dieser Enzymreaktion, als auch die Produkte nach vollständigem Ablaufen der Biotransformation im Gewebe von *A.cavernicola* quantifiziert. Fütterungsversuche mit den isolierten Substanzen ergaben, daß für den chemischen Fraßschutz dieses Schwammes im wesentlichen durch den Metaboliten Aerothionin und das Pigment verantwortlich sind.

Nach einer Verletzung des Schwammes kommt es zur Transformation des Aerothionins, und die Metaboliten Aeroplysinin-1 und Dienon entstehen. Diese erwiesen sich in meinen Fütterungsversuchen weniger wirkungsvoll als Fraßschutz als die Ausgangssubstanz Aerothionin. Die durch Verletzung induzierte Enzymreaktion führt also zu einer Abschwächung des Fraßschutzes bei *A.cavernicola*. Der ökologische Nutzen, der aus der Biotransformation der Metaboliten für den Schwamm entsteht, wird diskutiert.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ca.:	circa
DC:	Dünnschichtchromatographie
DCM:	Dichlormethan
et al.:	<i>et altera</i> (und andere)
EtOH:	Ethanol
g:	Gramm
H ₂ O:	Wasser
H x B x T:	Höhe mal Breite mal Tiefe
HPLC:	Hochleistungsflüssigchromatographie
Konz.:	Konzentration
MeOH:	Methanol
mg:	Milligramm
MHz:	Megahertz
min.:	Minute
ml:	Milliliter
n:	Anzahl
N:	Stickstoff
NH ₃ :	Ammoniak
nm:	Nanometer
NMR:	Kernresonanz
RT:	Retentionszeit
Std.abw.:	Standardabweichung
Std.fehler:	Standardfehler
Tab.:	Tabelle
UV:	Ultraviolett
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer

8. Anhang

Fütterungsexperimente mit den Rohextrakten	110
HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte	115
HPLC-Chromatogramme der Fraktionen des Extraktes von <i>A.cavernicola</i>	120
HPLC-Chromatogramme und UV-Spektren der isolierten Reinsubstanzen	123
Eichgeraden	127
Fütterungsexperimente mit den Reinsubstanzen	129

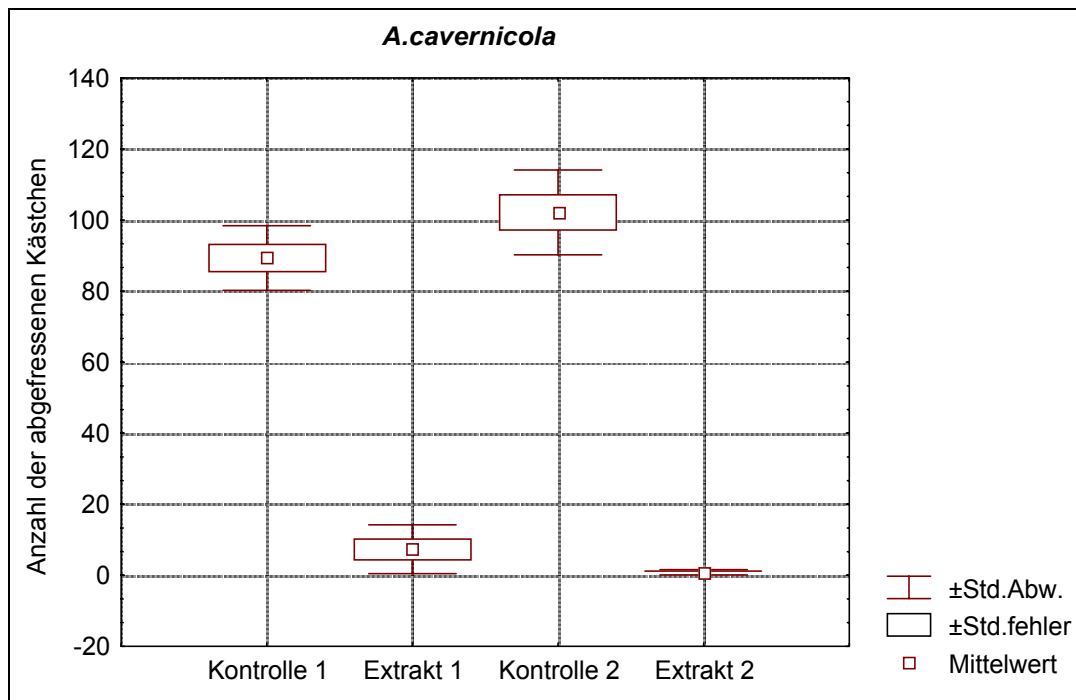


Abb.A.1.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *A.cavernicola* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

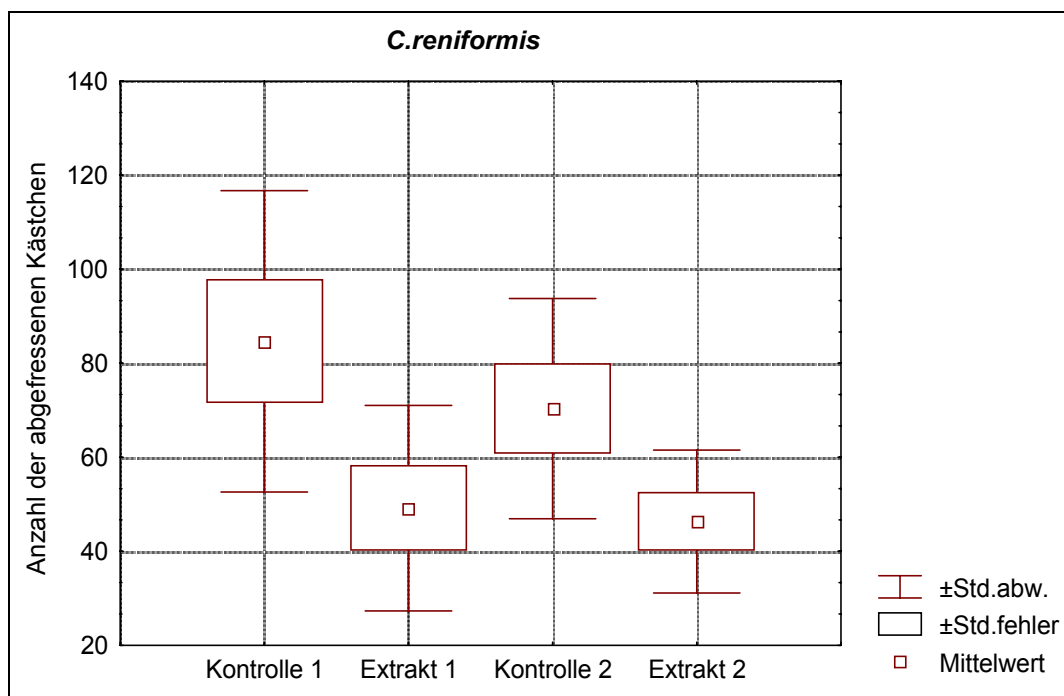


Abb.3.2.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *C.reniformis* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

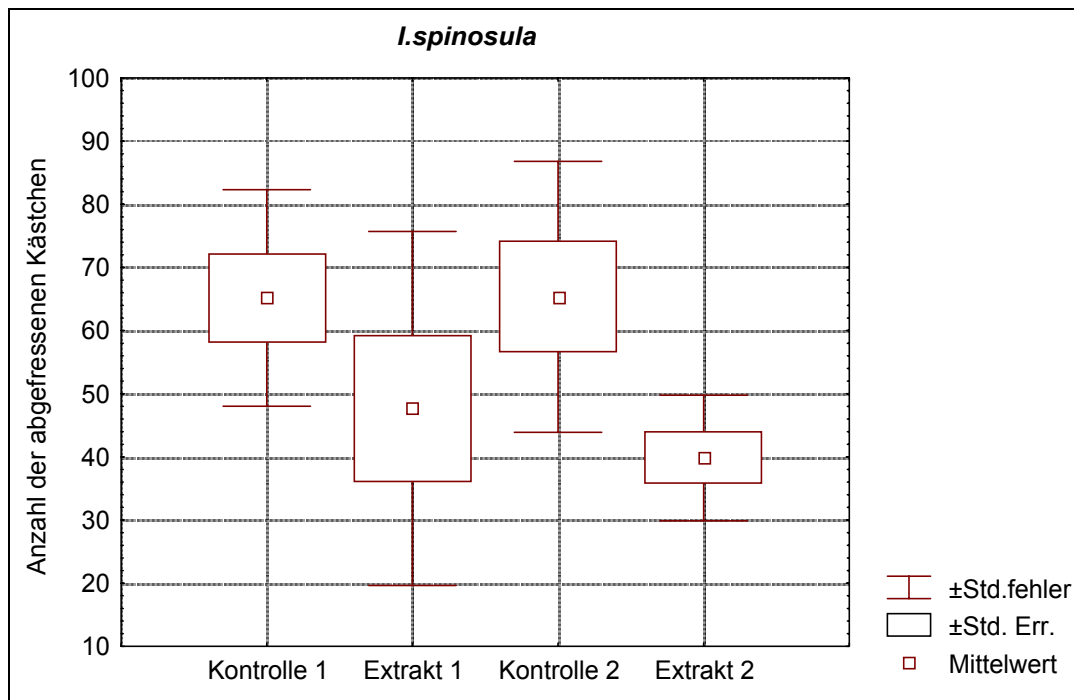


Abb.3.3.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *I. spinosula* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

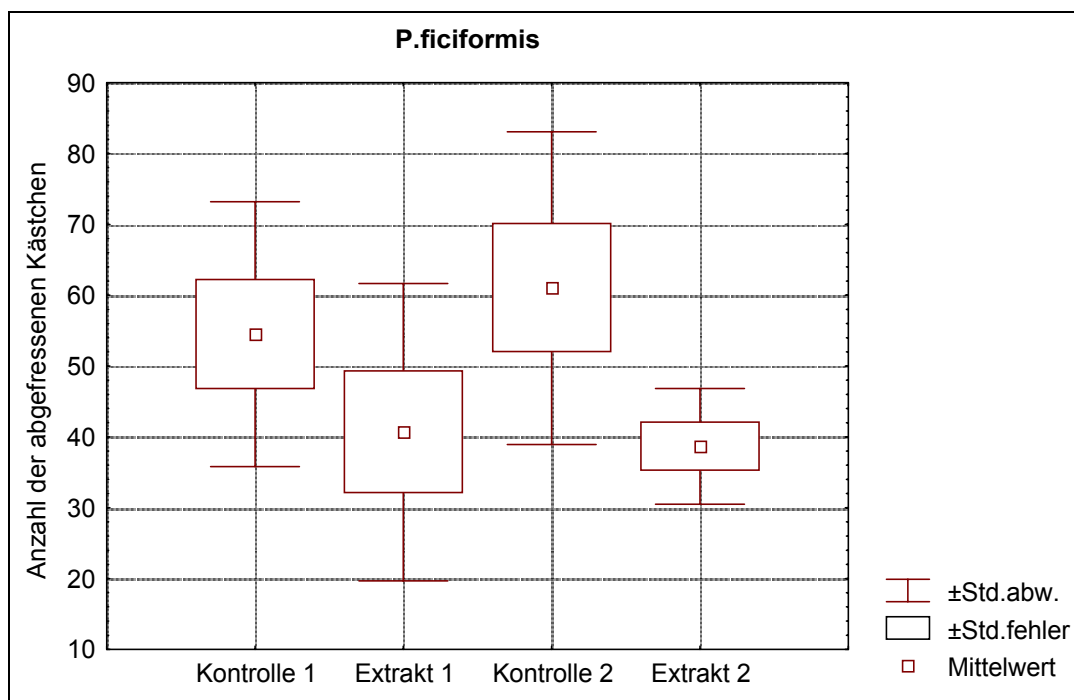


Abb.3.4.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *P. ficiformis* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

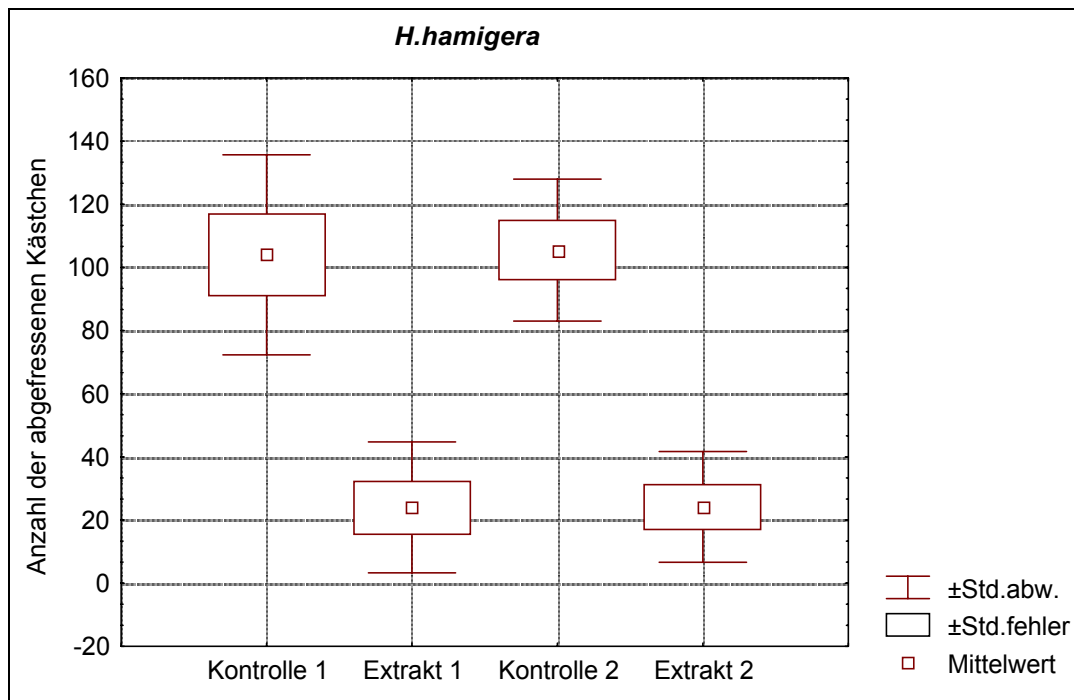


Abb.3.5.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *H.hamigera* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

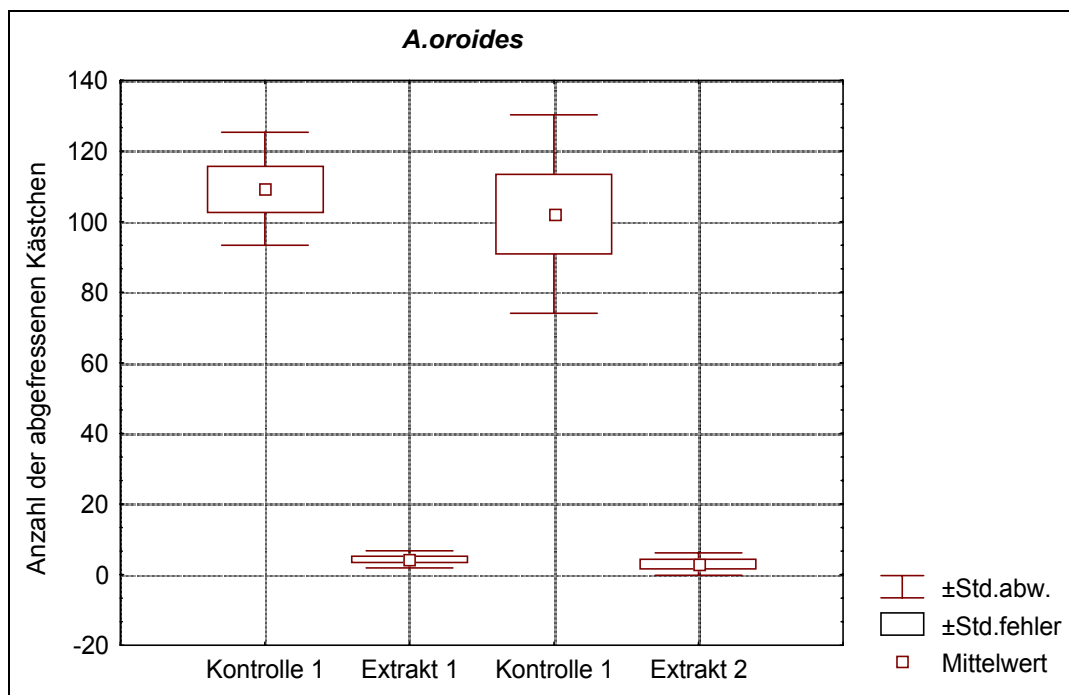


Abb.3.6.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *A.oroïdes* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

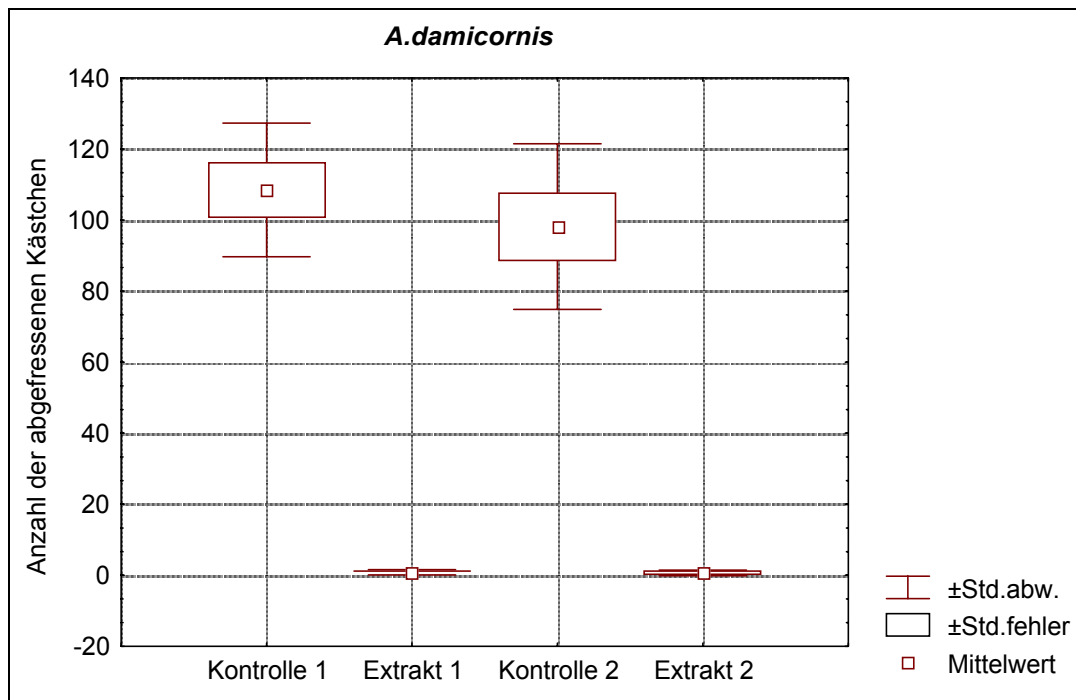


Abb.3.7.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *A. damicornis* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

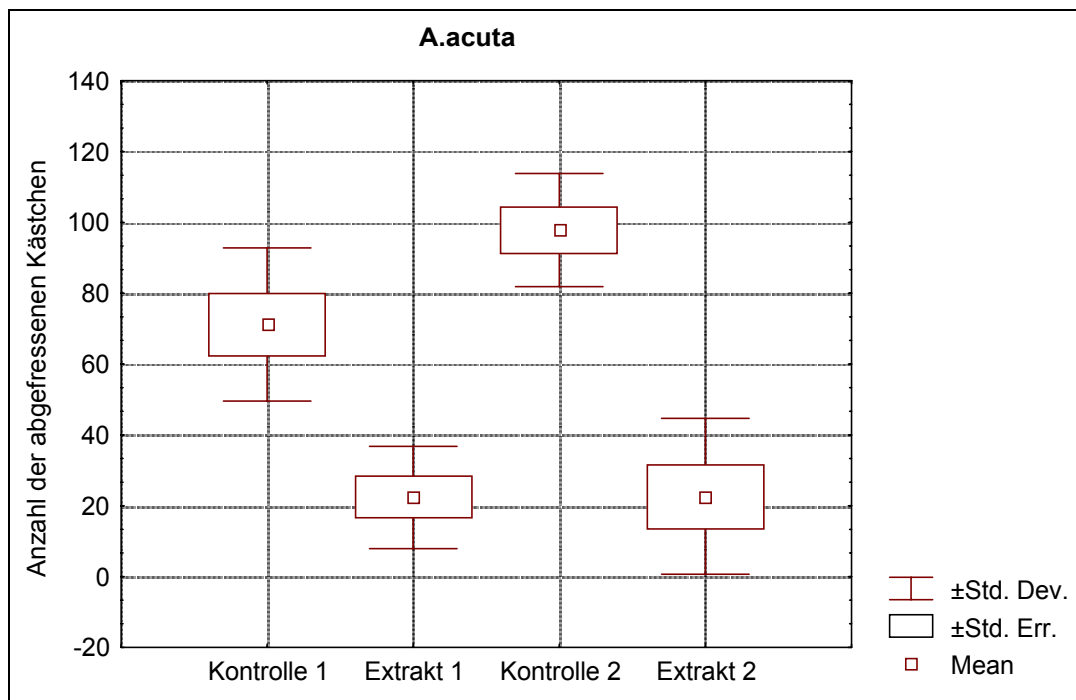


Abb.3.8.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *A. acuta* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

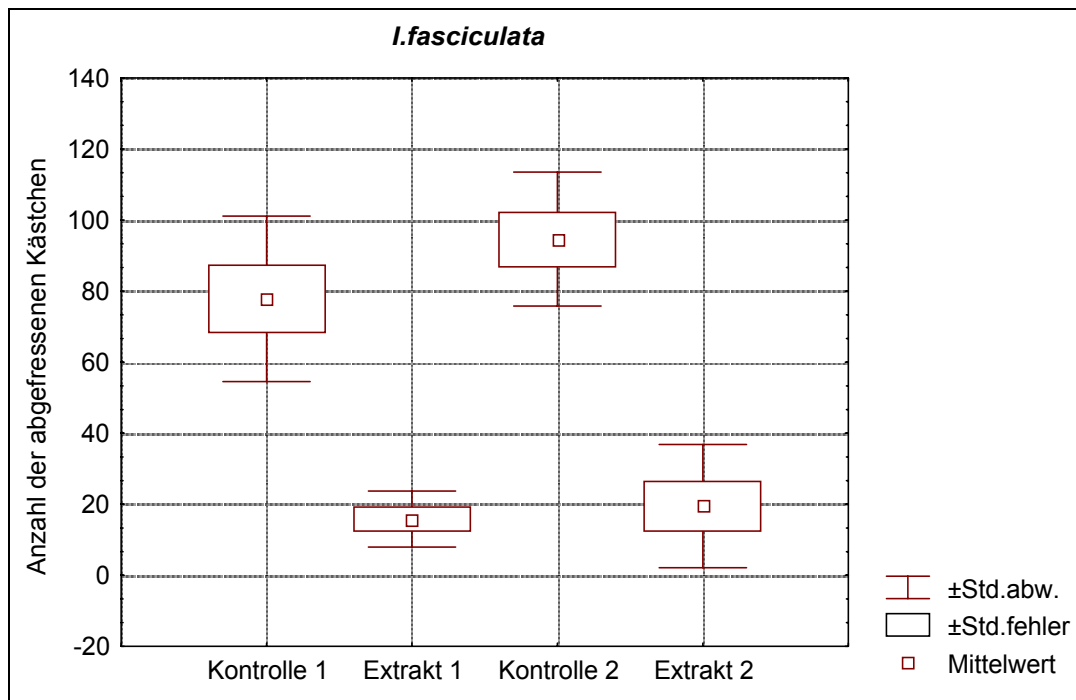


Abb.3.9.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *I. fasciculata* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

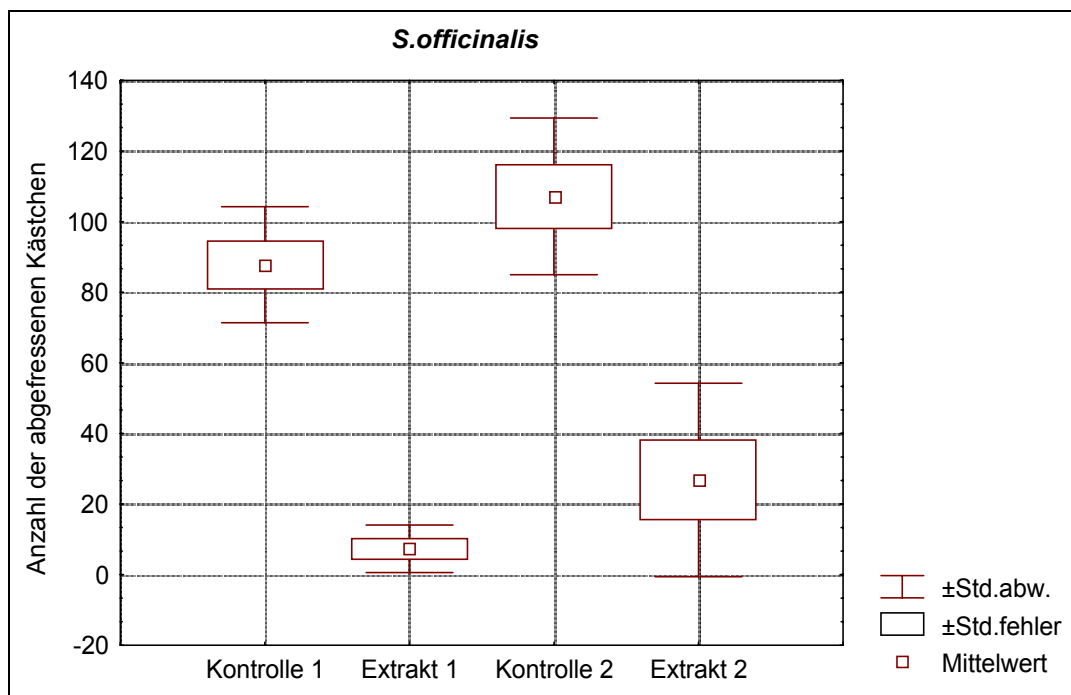


Abb.3.10.: Ergebnisse der Fütterungsversuche mit dem Rohextrakt von *S. officinalis* (2 Versuchsdurchgänge mit je 6 Futterstreifen)

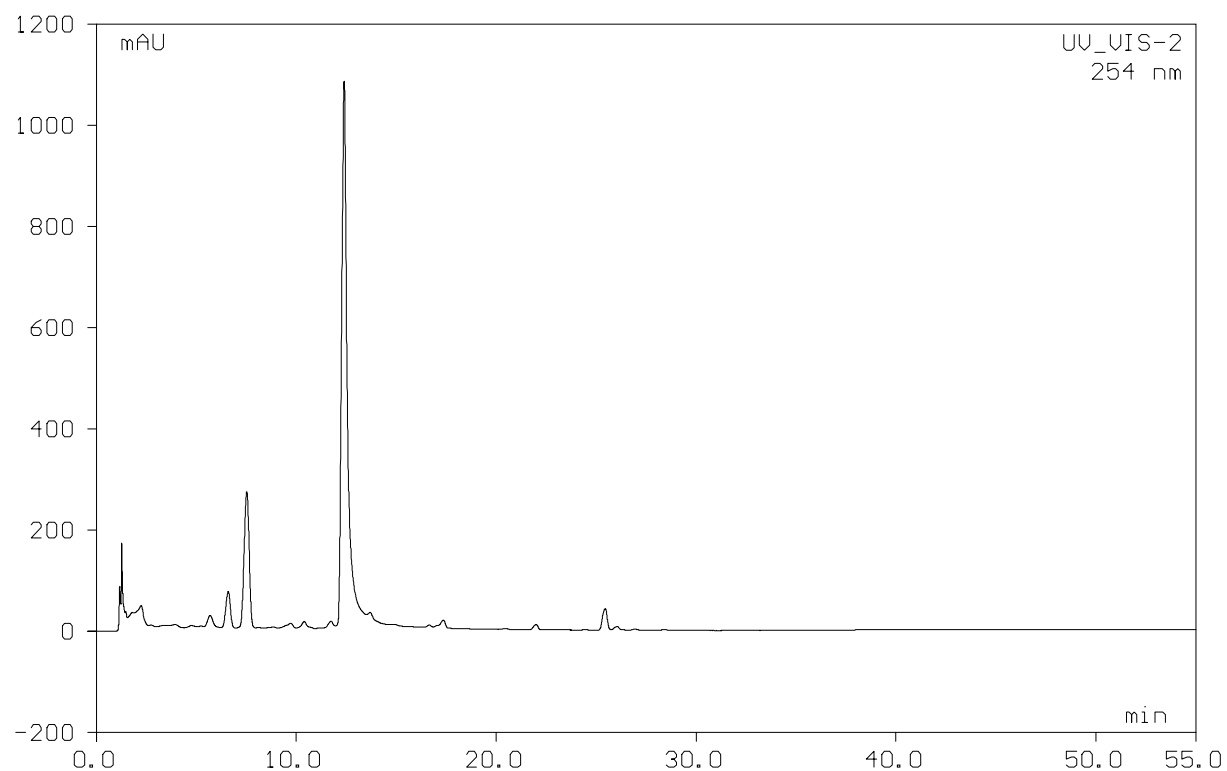


Abb.A.11.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Aplysina cavernicola*

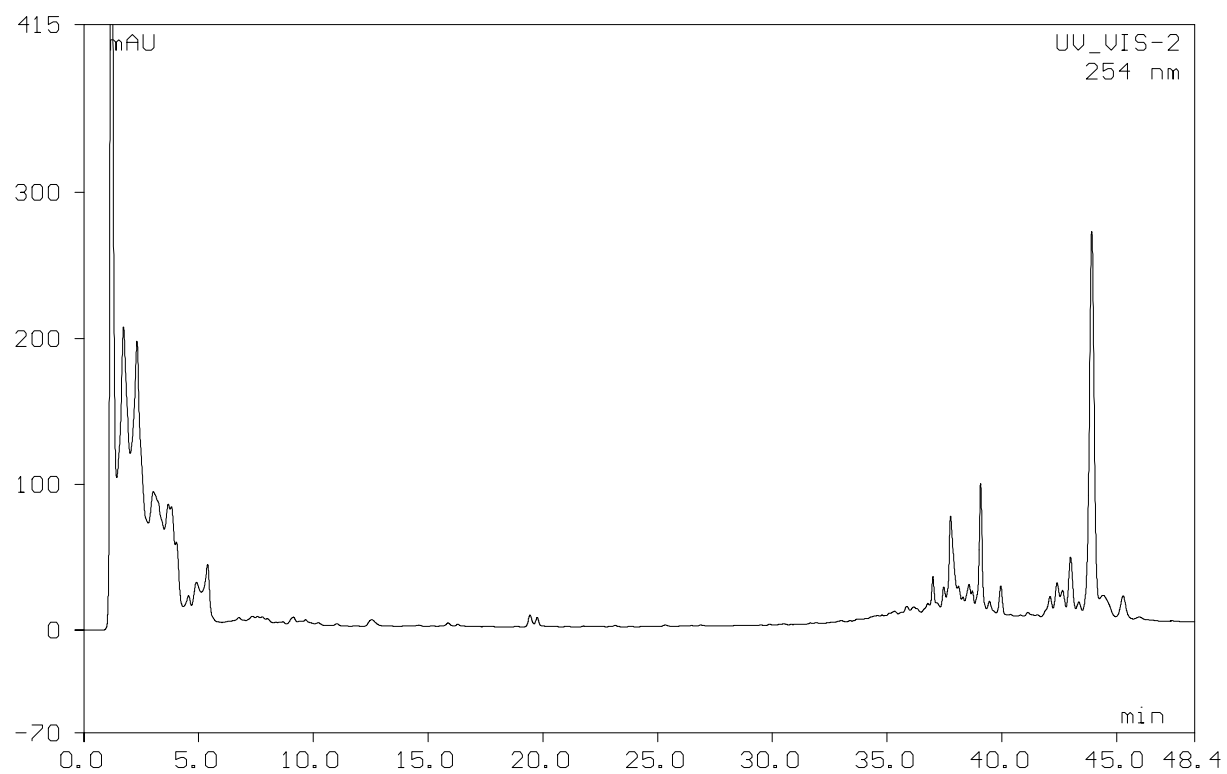


Abb.A.12.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chondrosia reniformis*

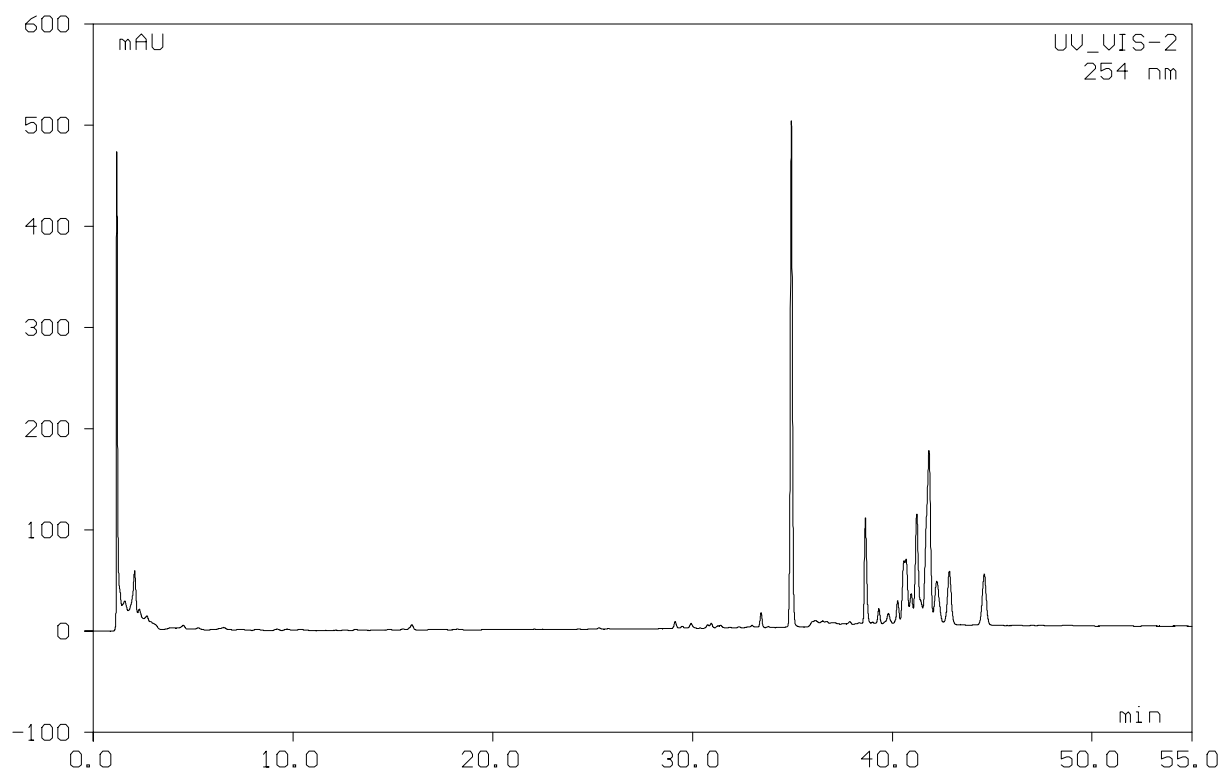


Abb.A.13.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Ircinia spinosula*

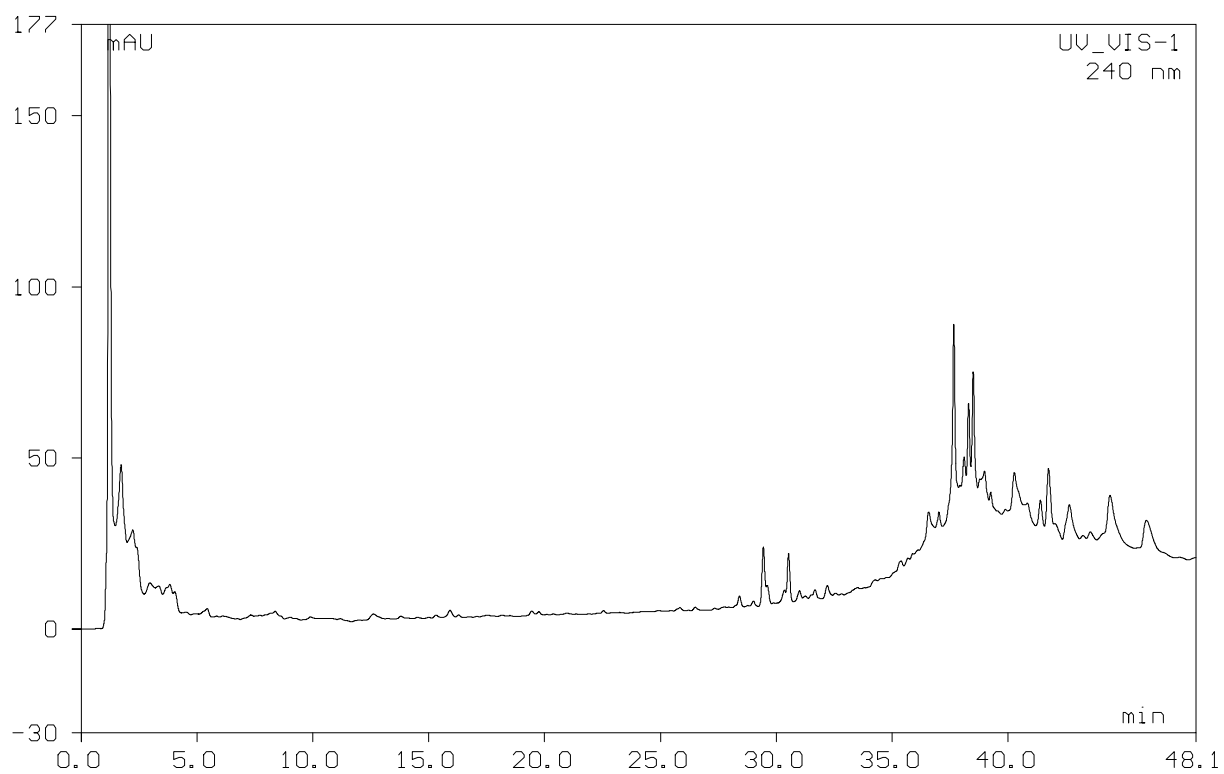


Abb.A.14.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Petrosia ficiformis*

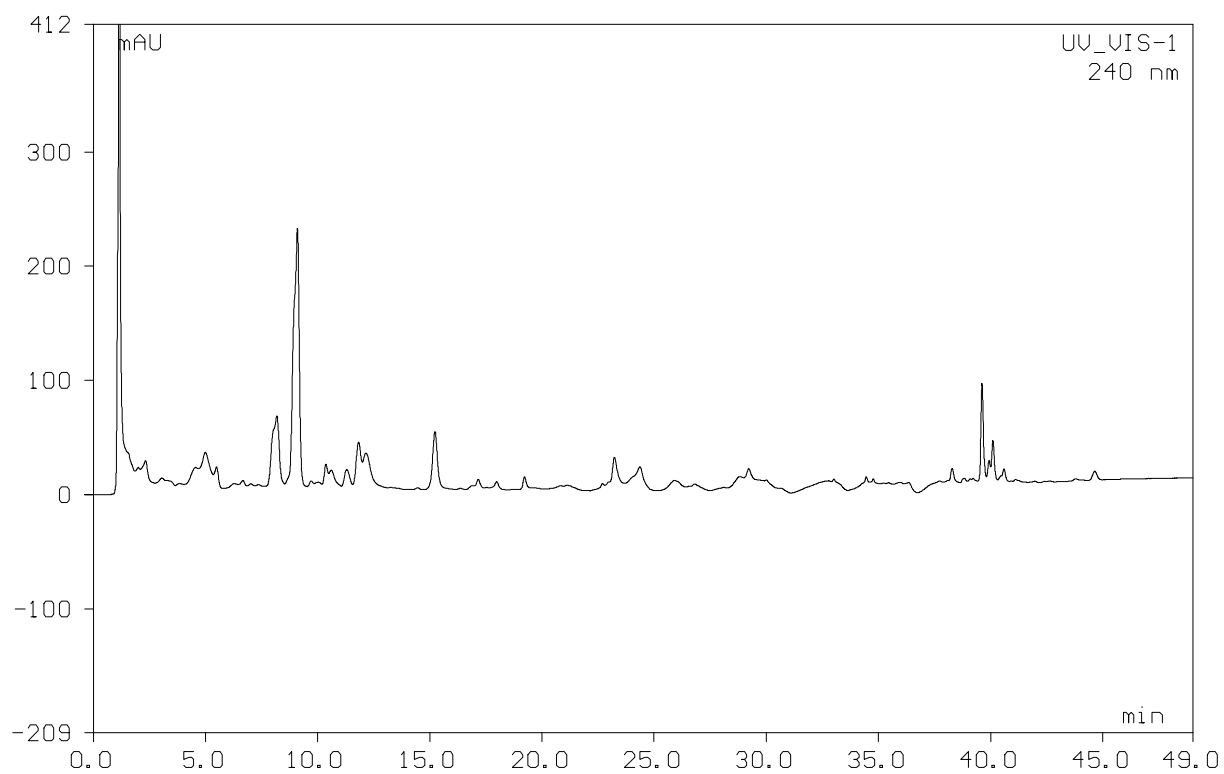


Abb.A.15.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Hamigera hamigera*

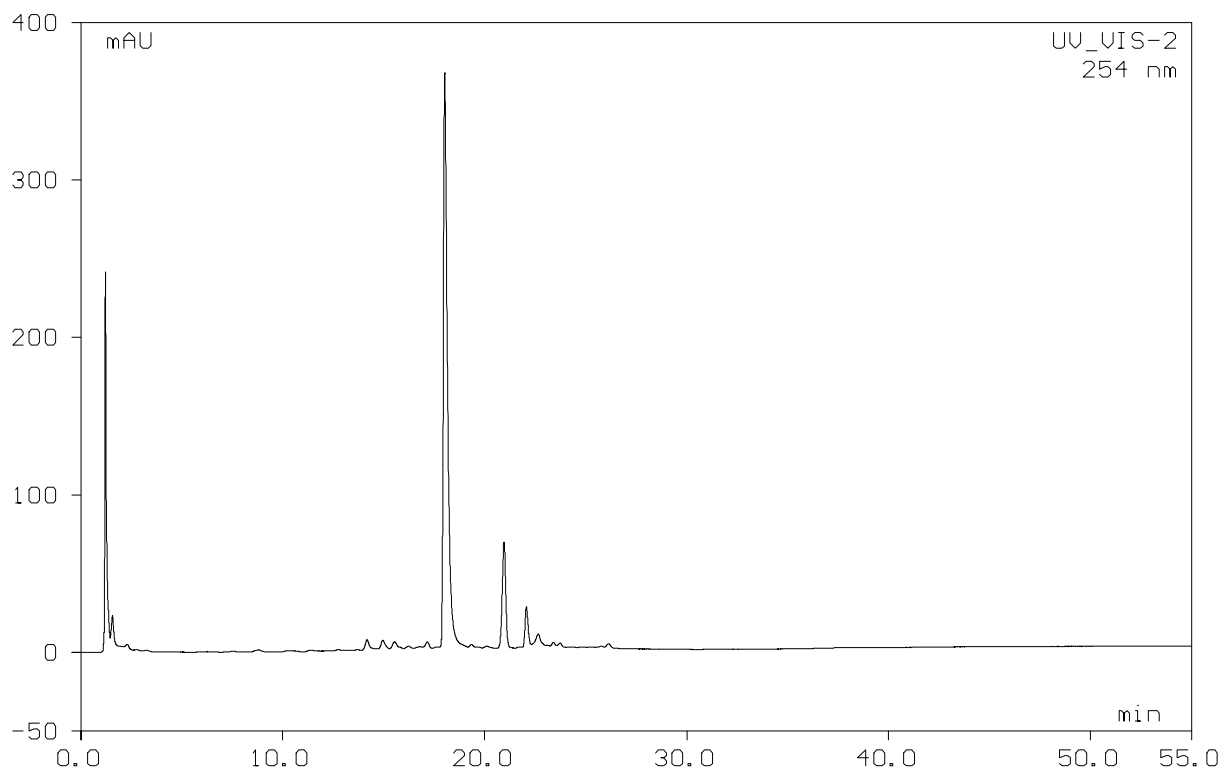


Abb.A.16.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agelas oroides*

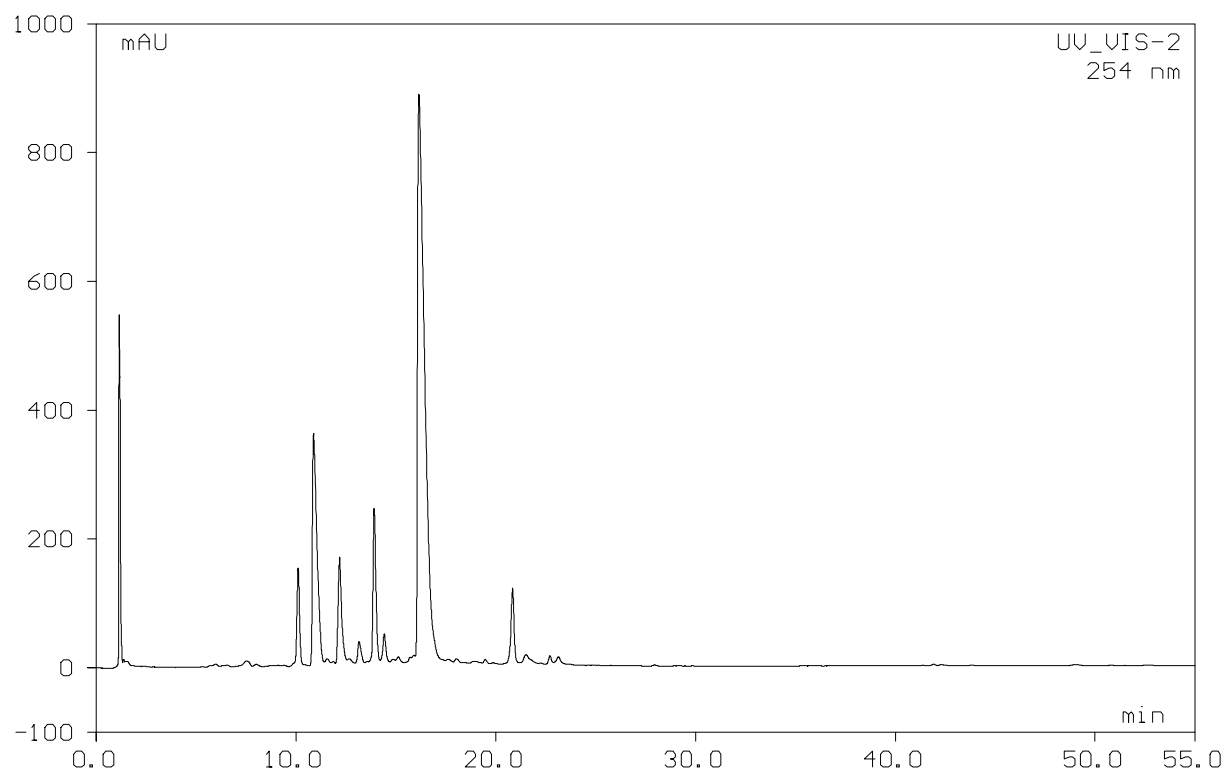


Abb.A.17.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Axinella damicornis*

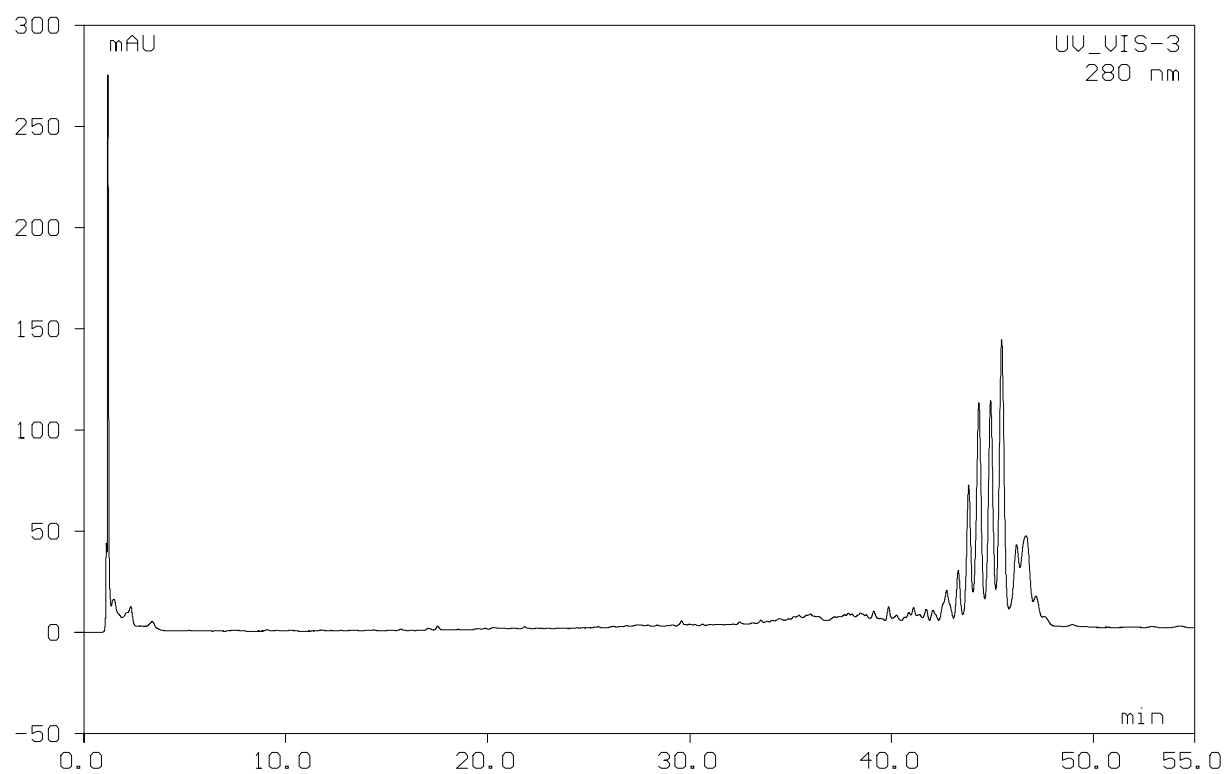


Abb.A.18.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Acanthella acuta*

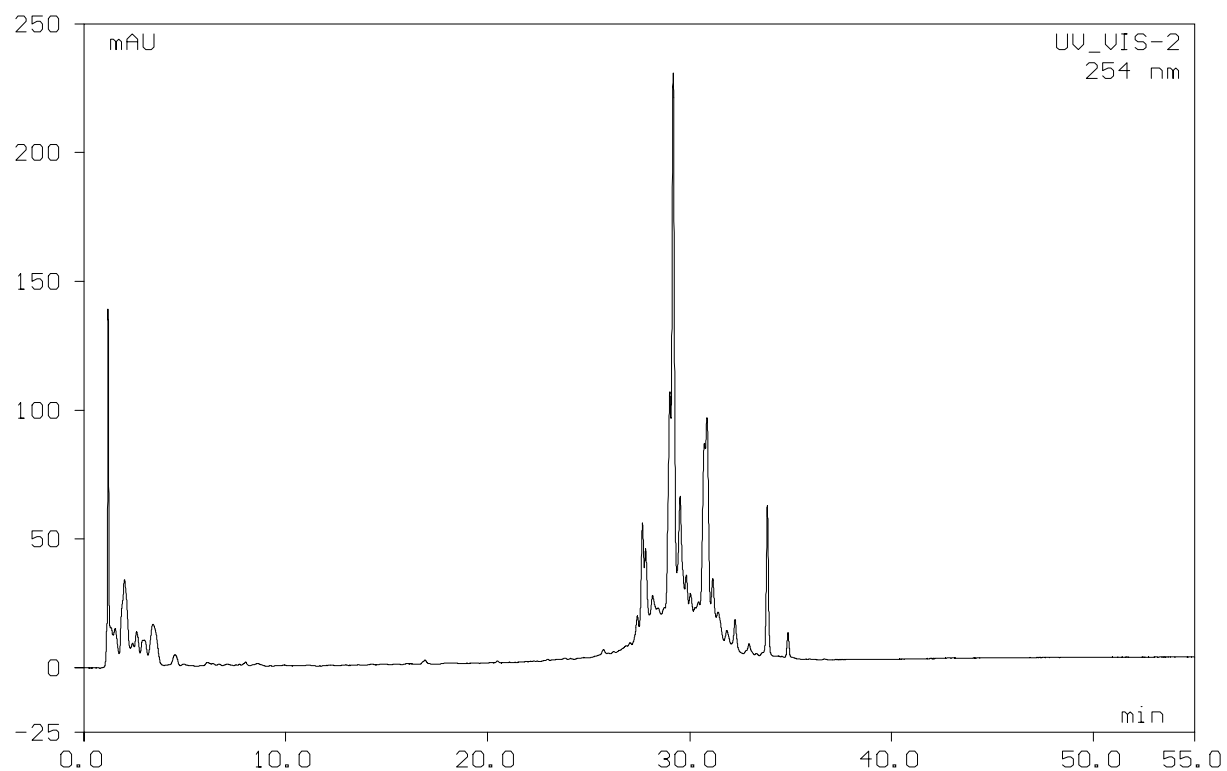


Abb.A.19.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Ircinia fasciculata*

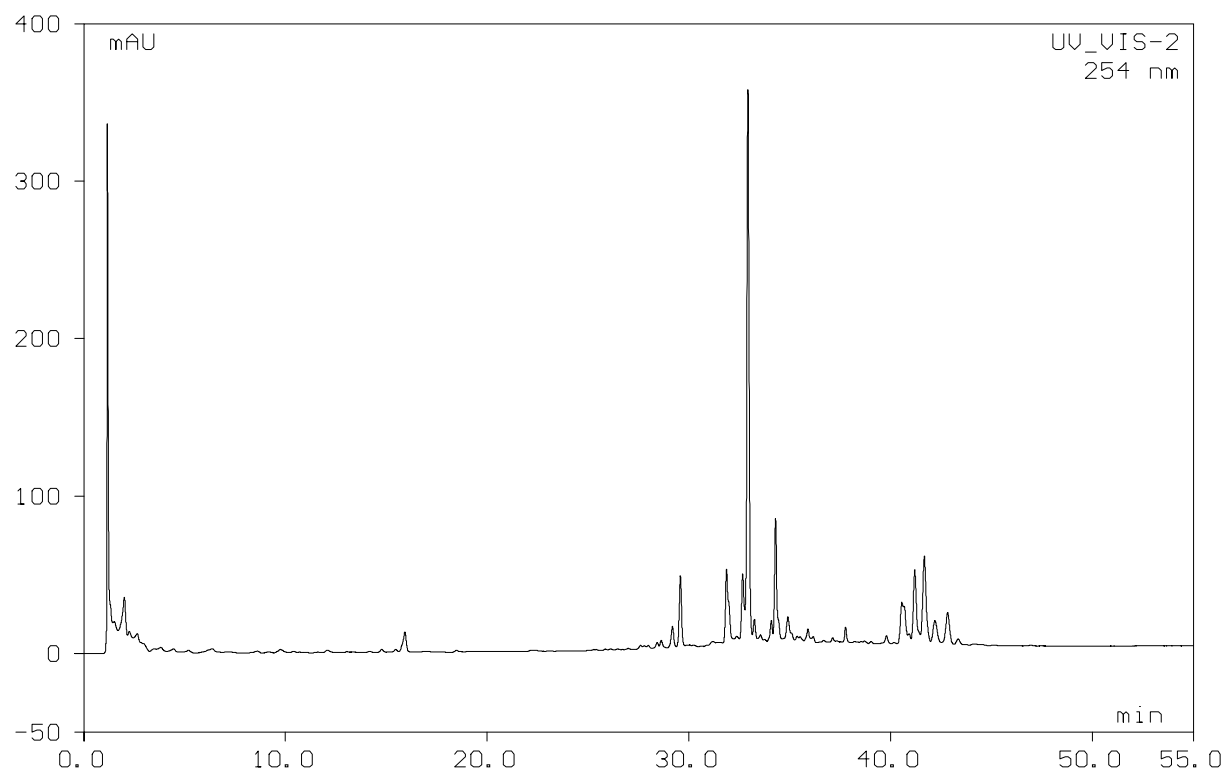


Abb.A.20.: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Spongia officinalis*

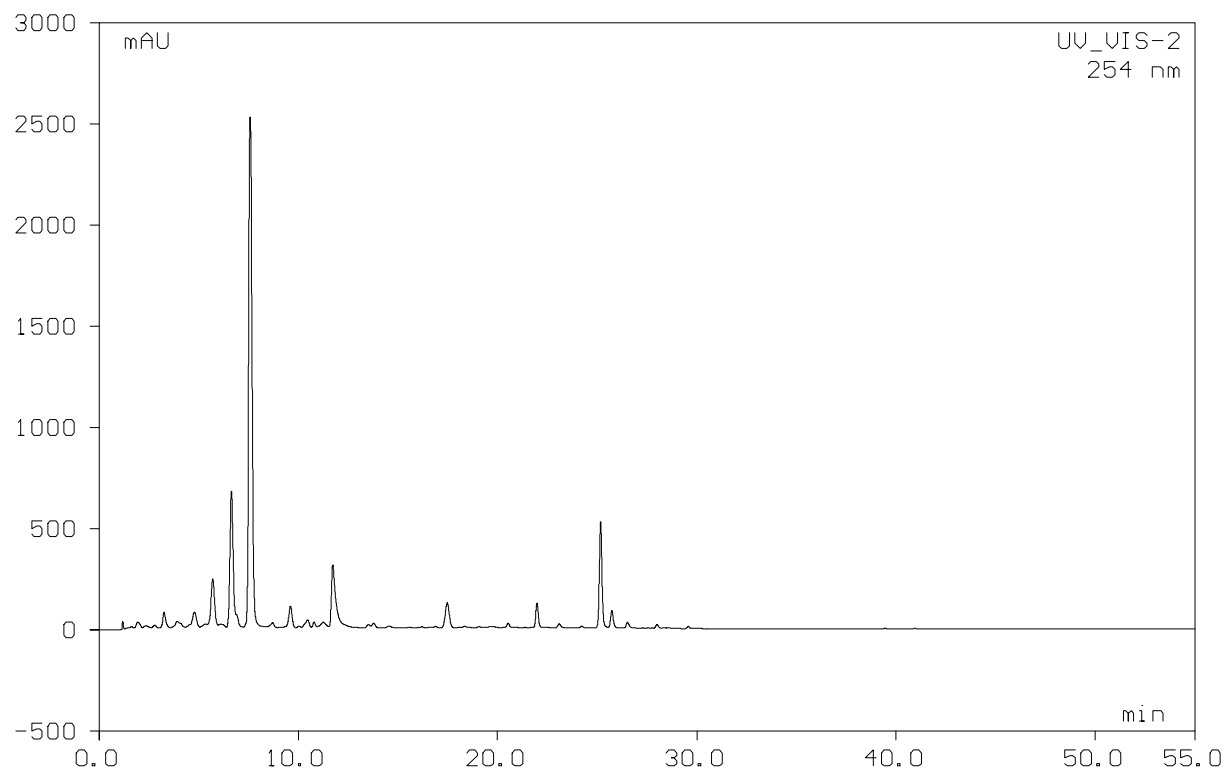


Abb.A.21.: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetatfraktion von *Aplysina cavernicola*

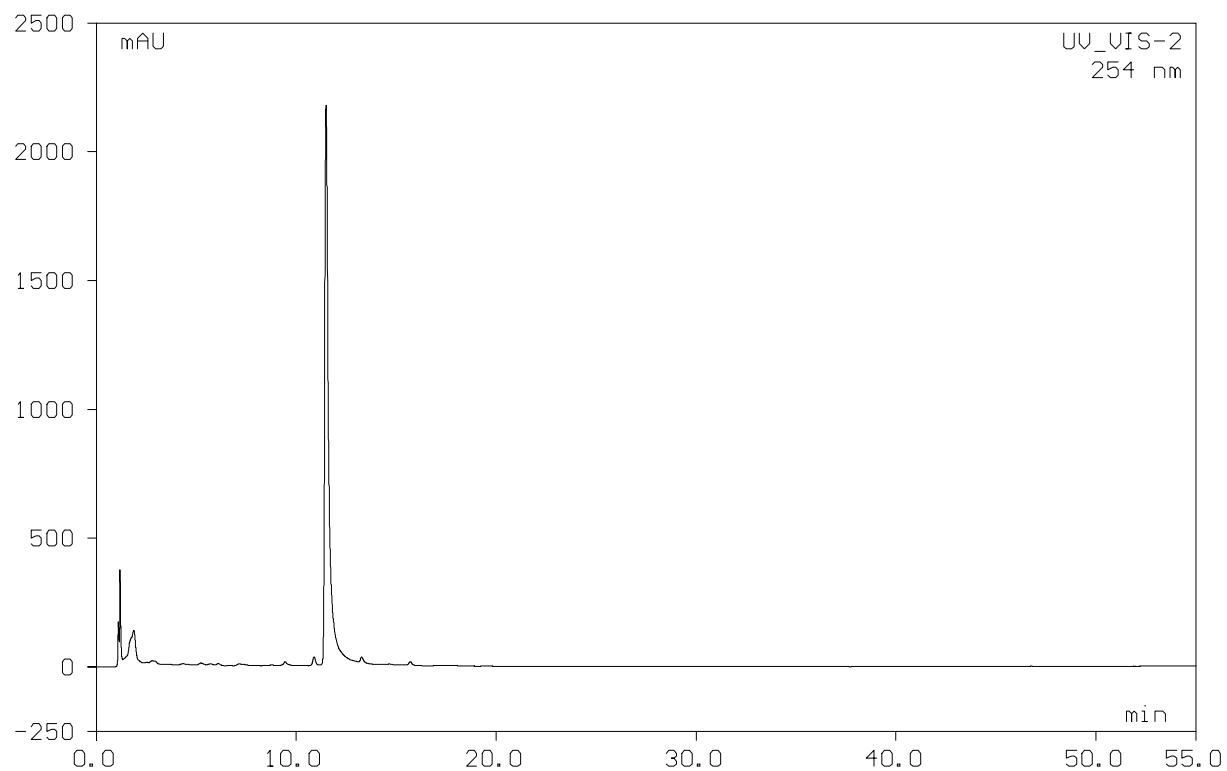


Abb.A.22.: HPLC-Chromatogramm der Wasserfraktion von *Aplysina cavernicola*

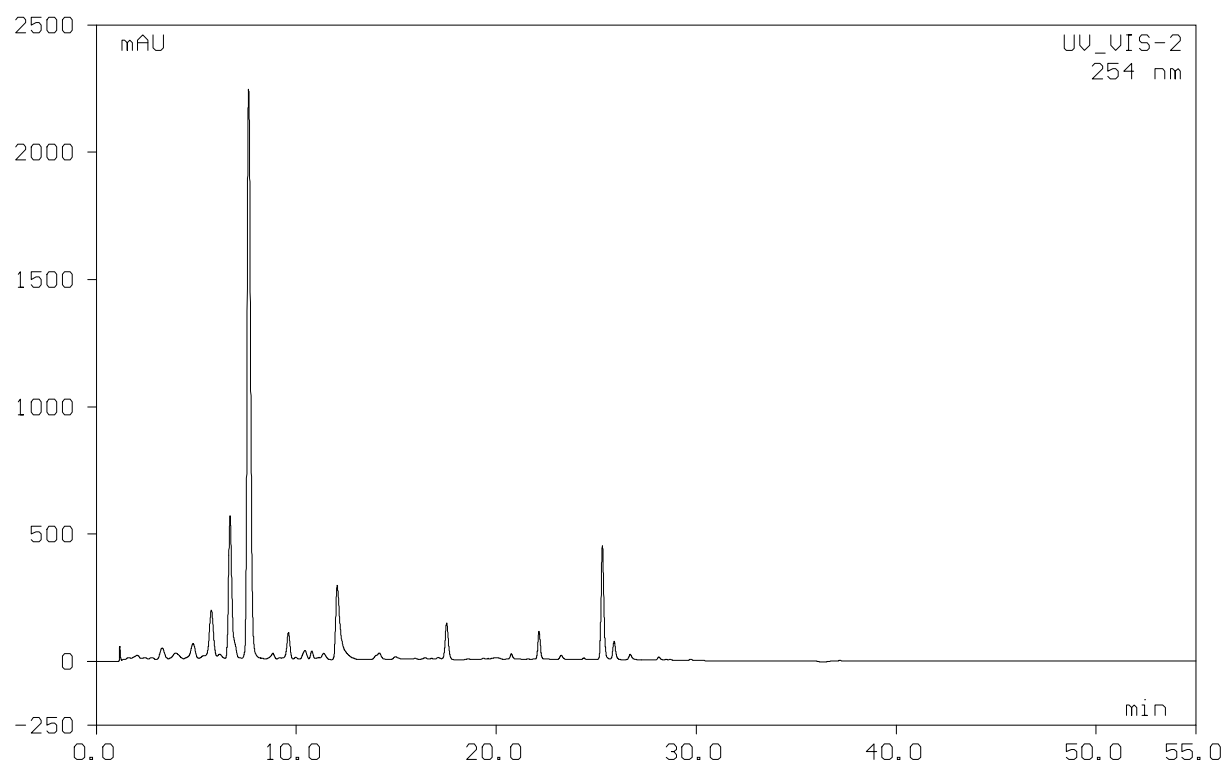


Abb.A.23.: HPLC-Chromatogramm der Methanol/Wasserfraktion von *A.cavernicola*

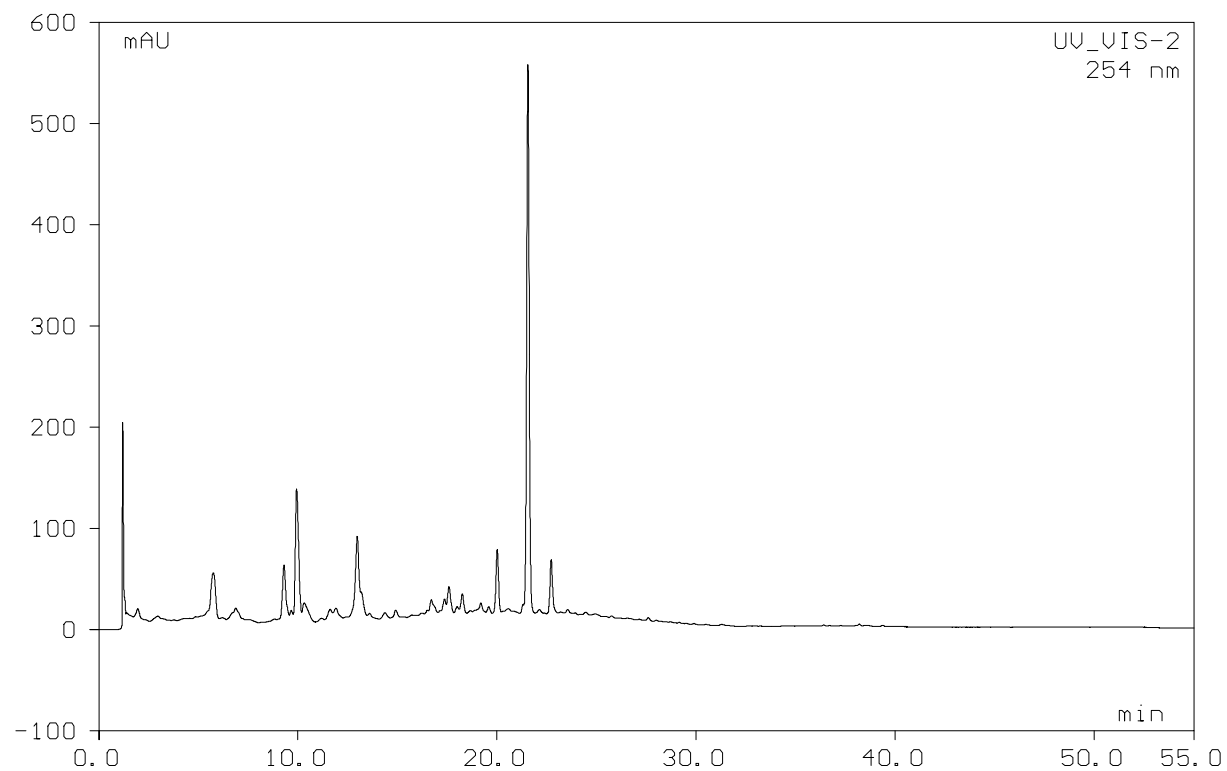


Abb.A.24.: HPLC-Chromatogramm der Sephadexfraktion 2 von *A.cavernicola*

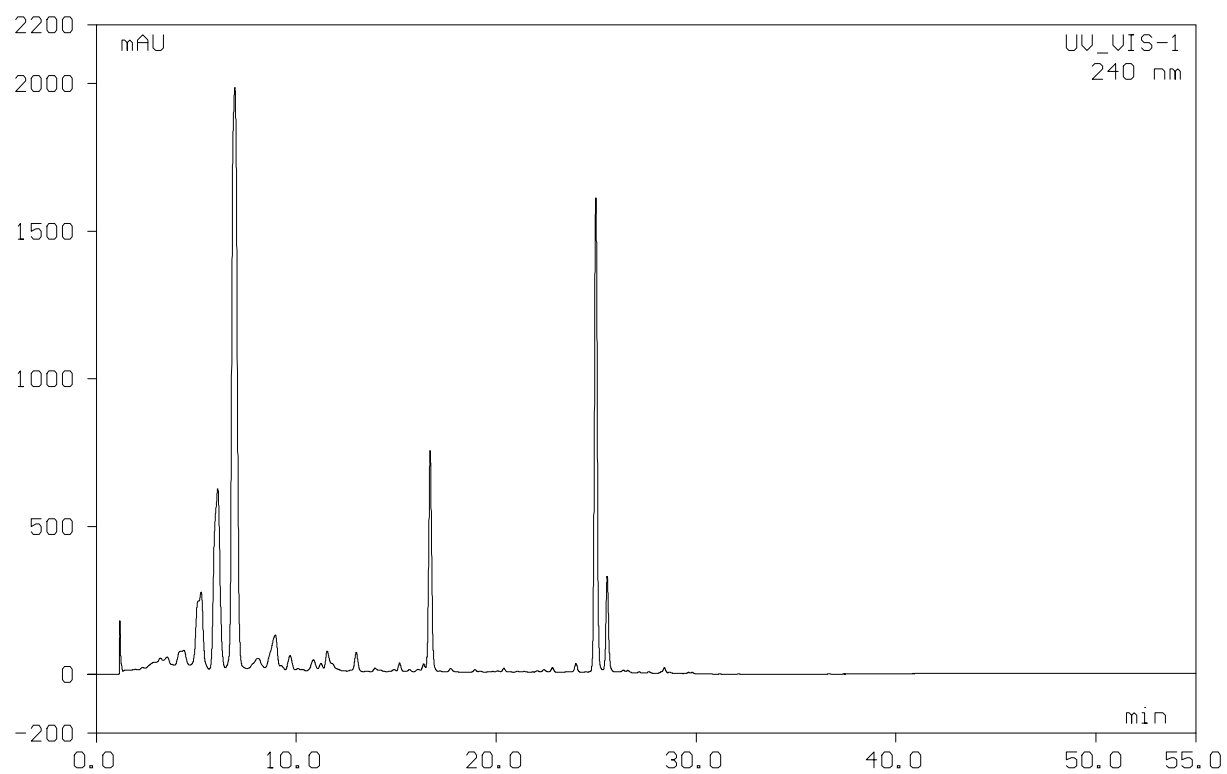


Abb.A.25.: HPLC-Chromatogramm der Sephadexfraktion 4 von *A.cavernicola*

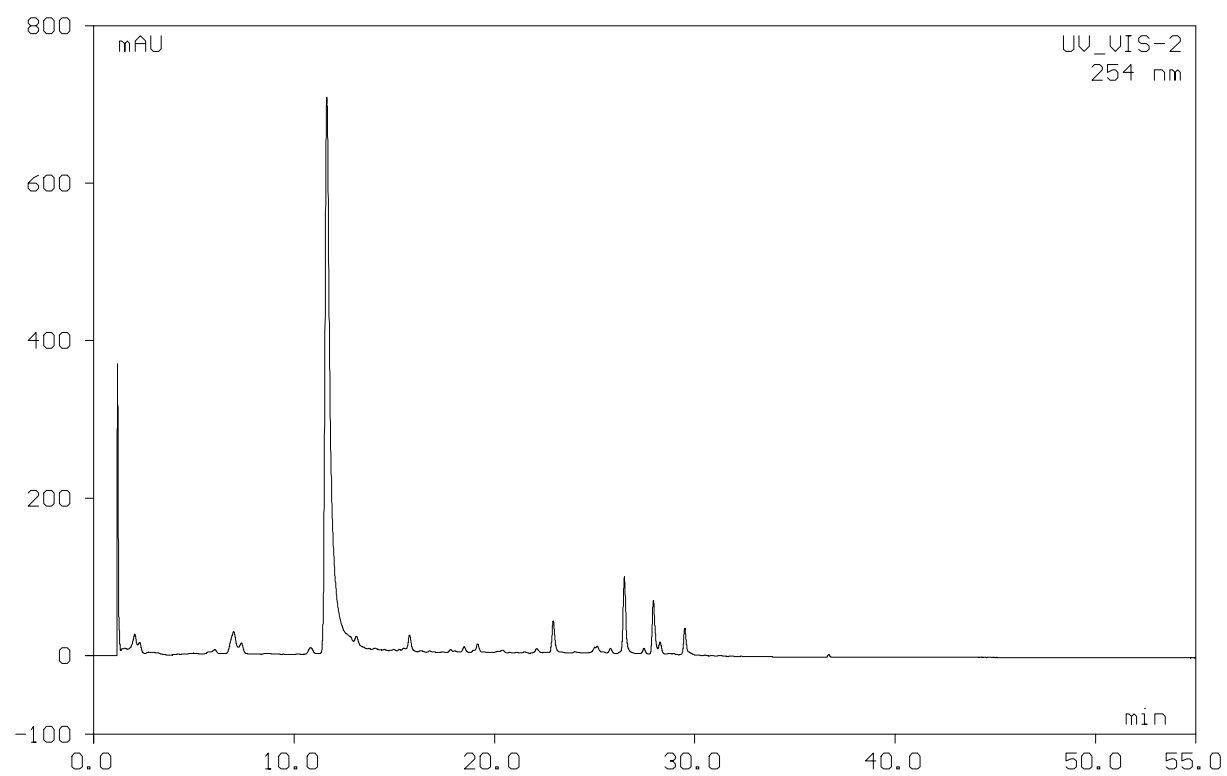
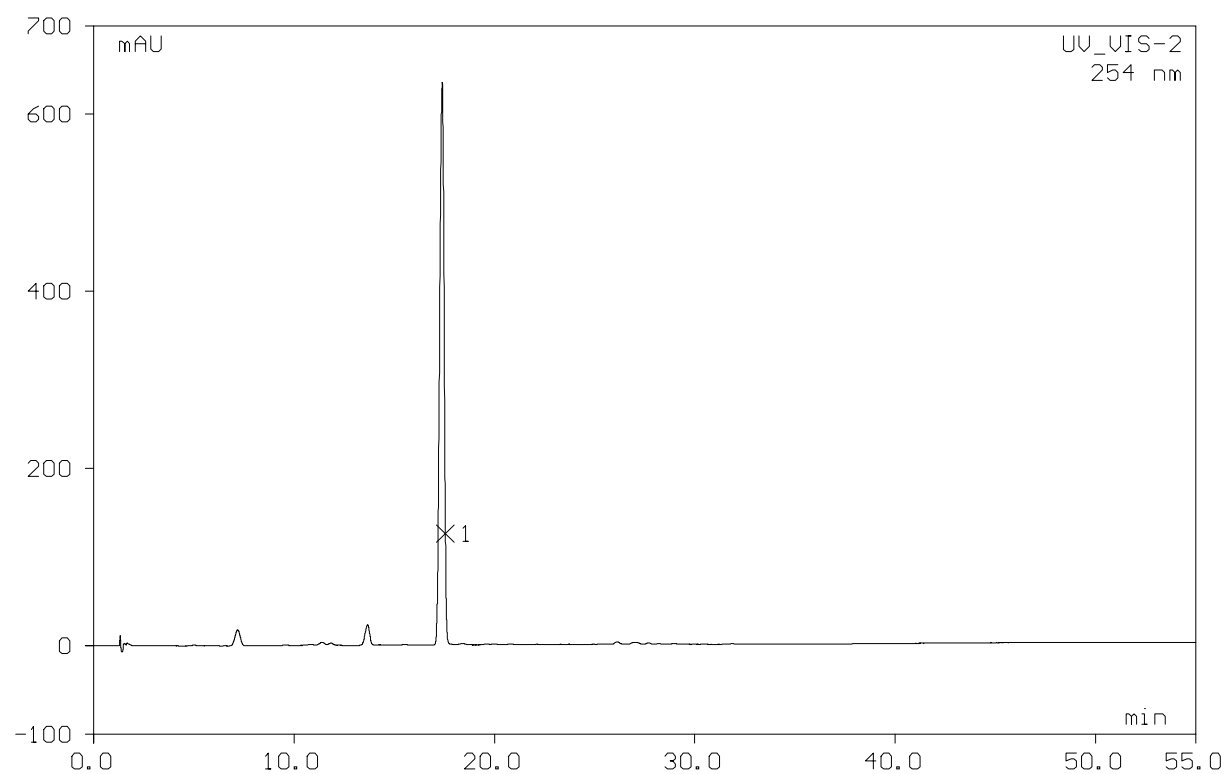
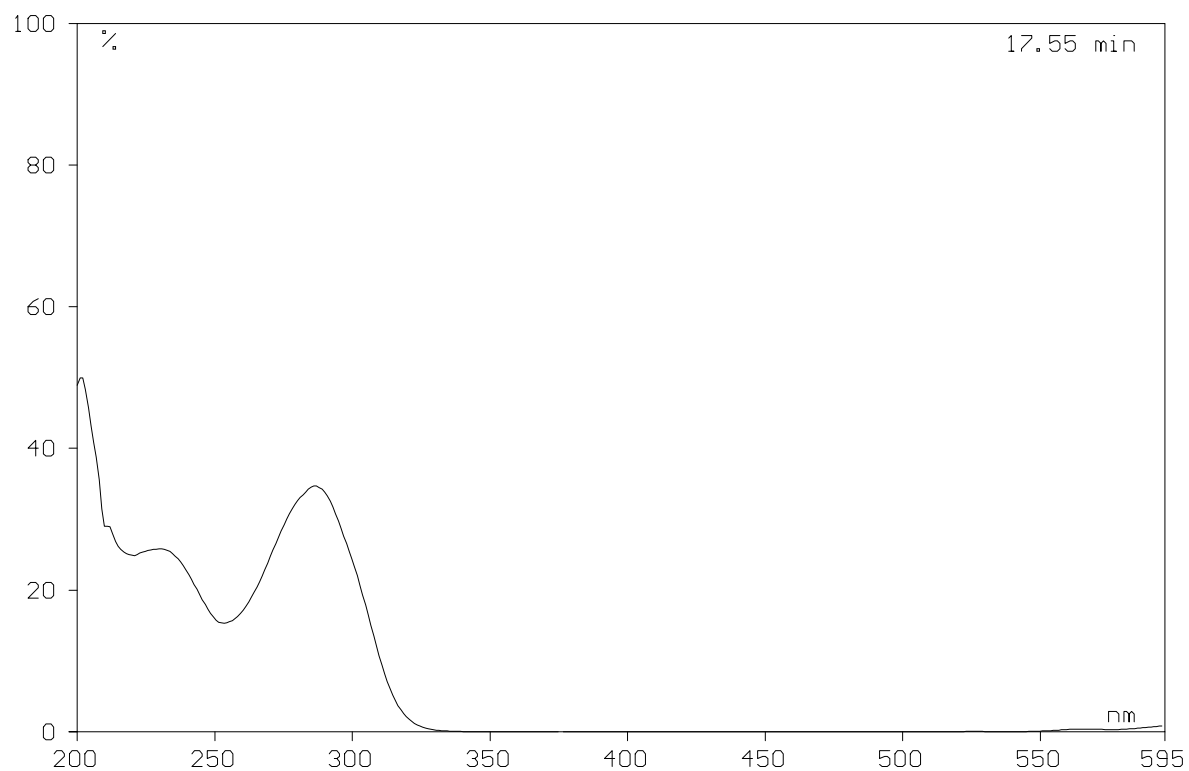
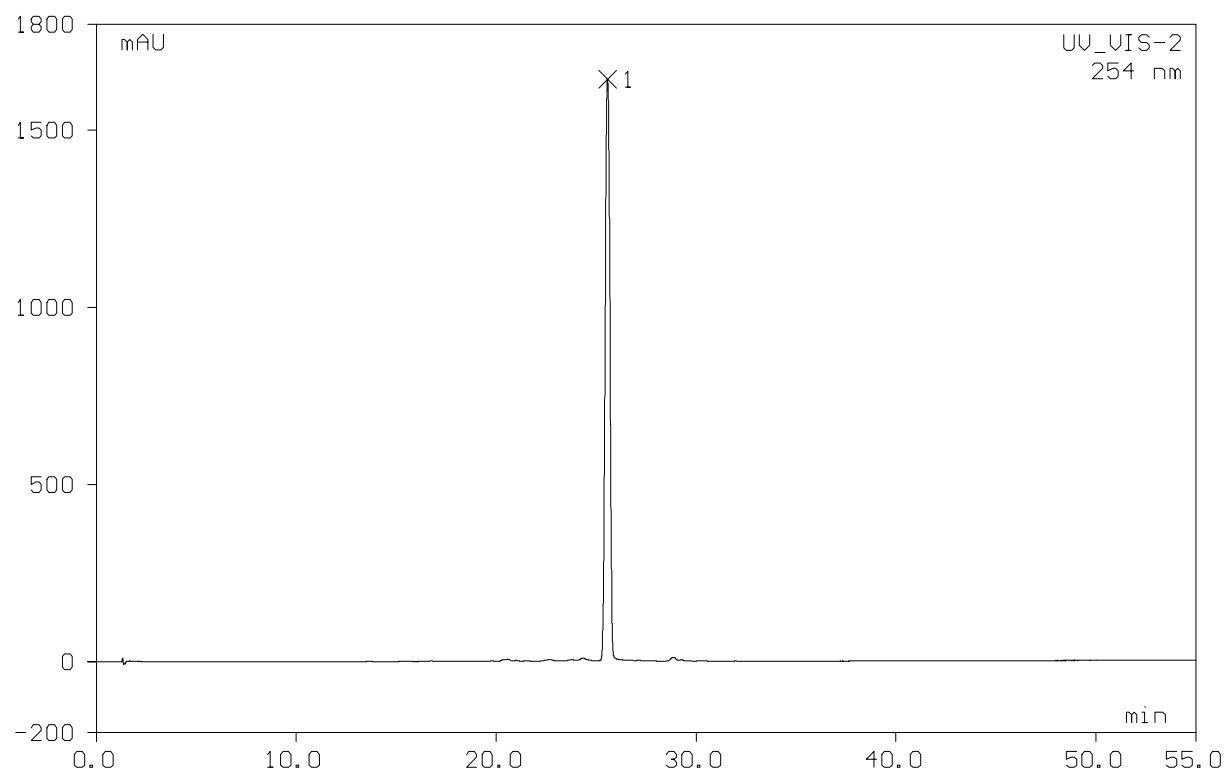
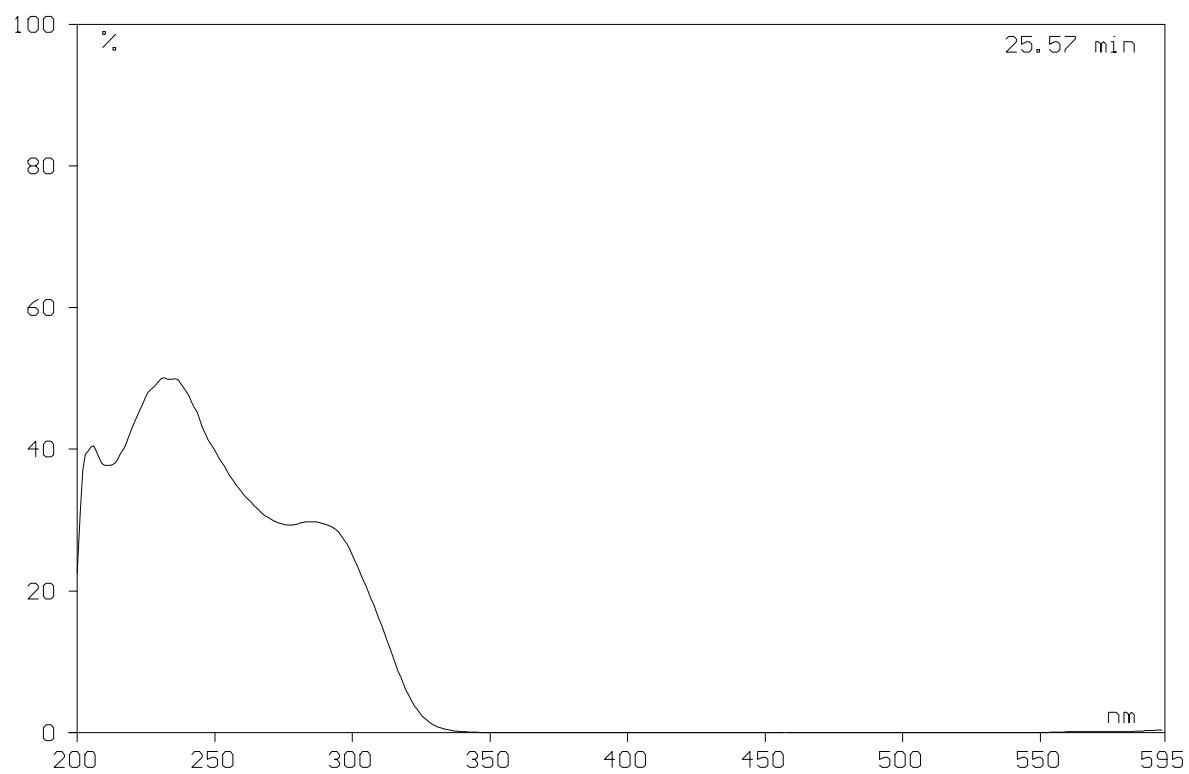


Abb.A.26.: HPLC-Chromatogramm der Sephadexfraktion 5 von *A.cavernicola*

**Abb.A.27.:** HPLC-Chromatogramm des Aeroplysinin-1**Abb.A.28.:** UV-Spektrum des Aeroplysinin-1

**Abb.A.29.:** HPLC-Chromatogramm des Aerothionins**Abb.A.30.:** UV-Spektrum des Aerothionins

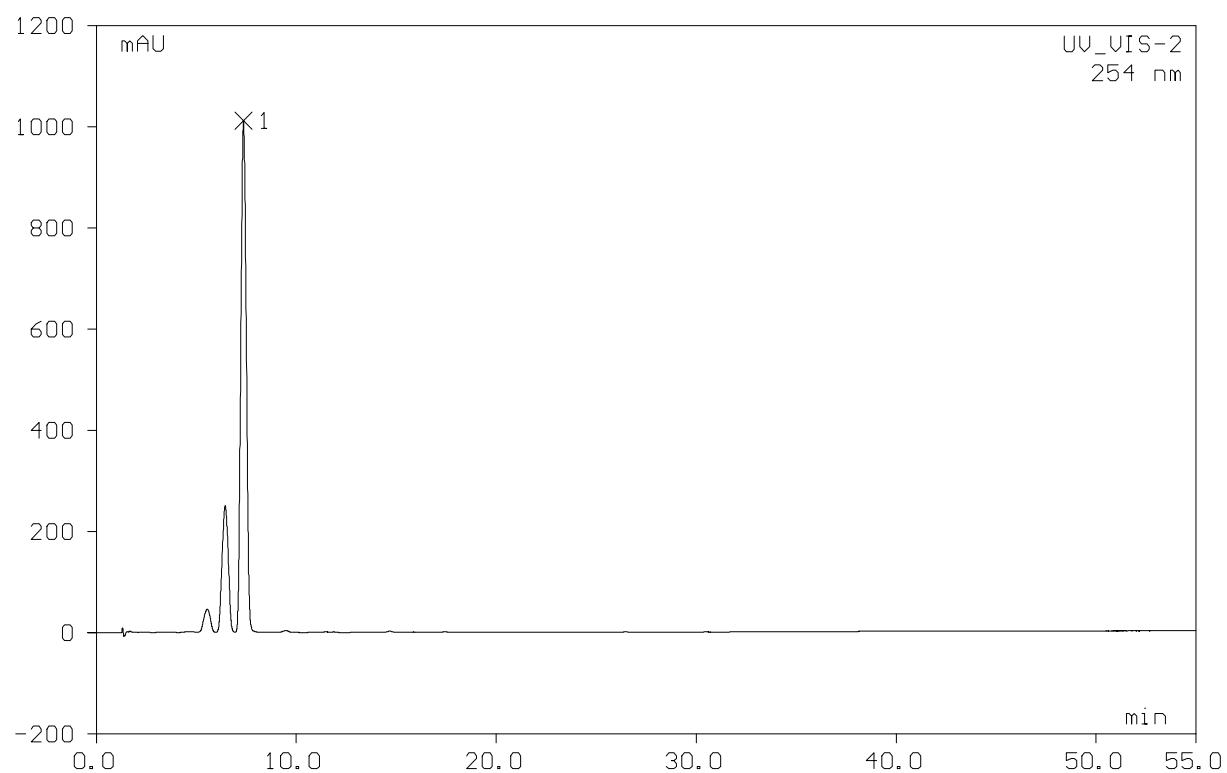


Abb.A.31.: HPLC-Chromatogramm des Dienons

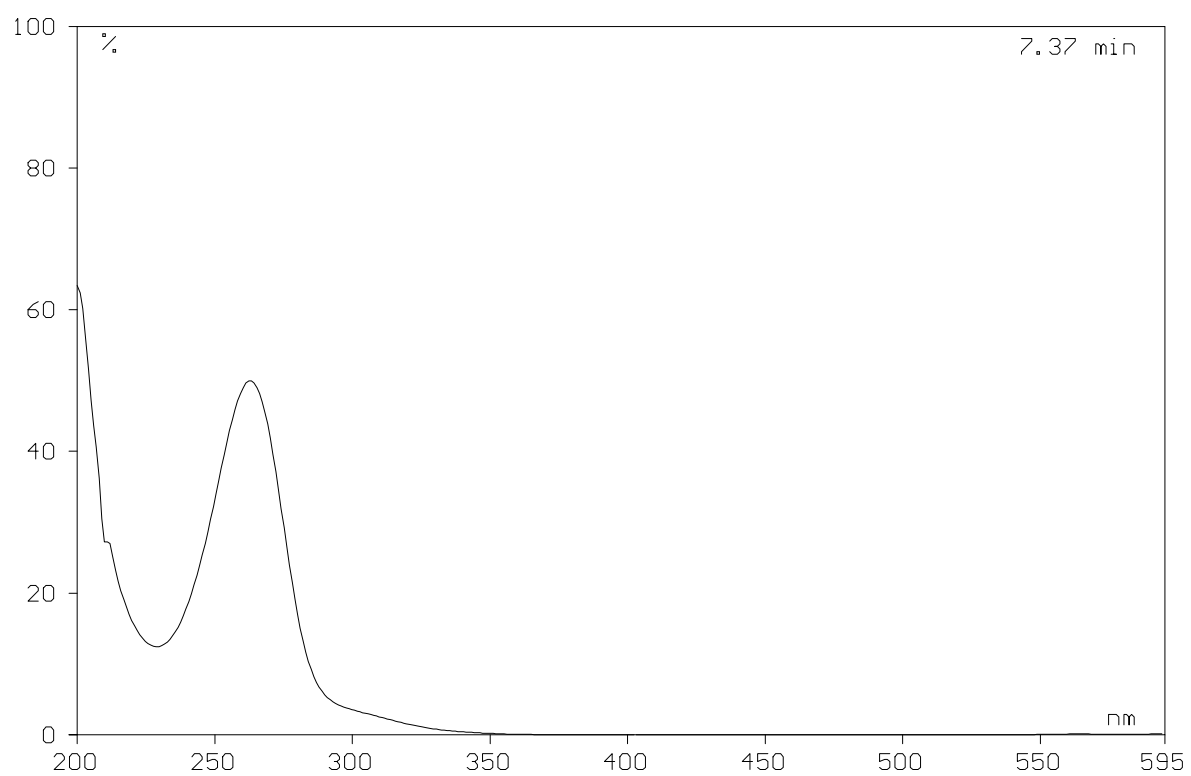
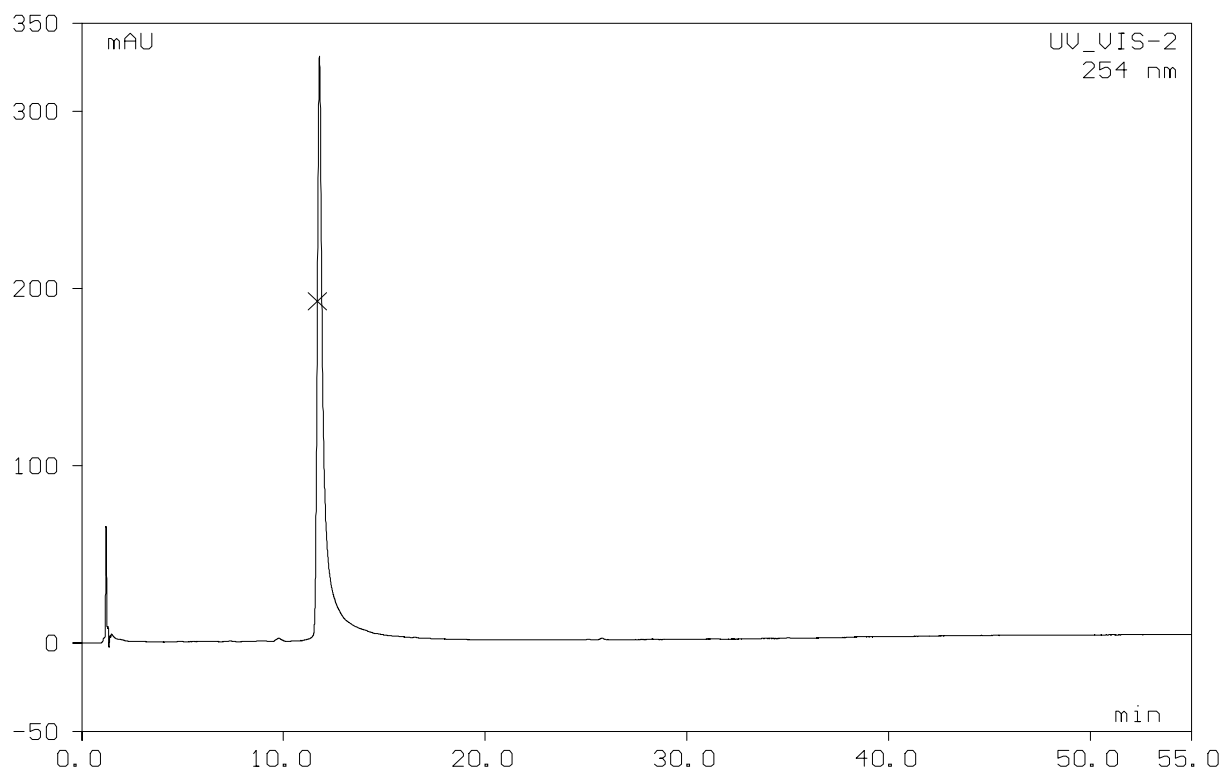
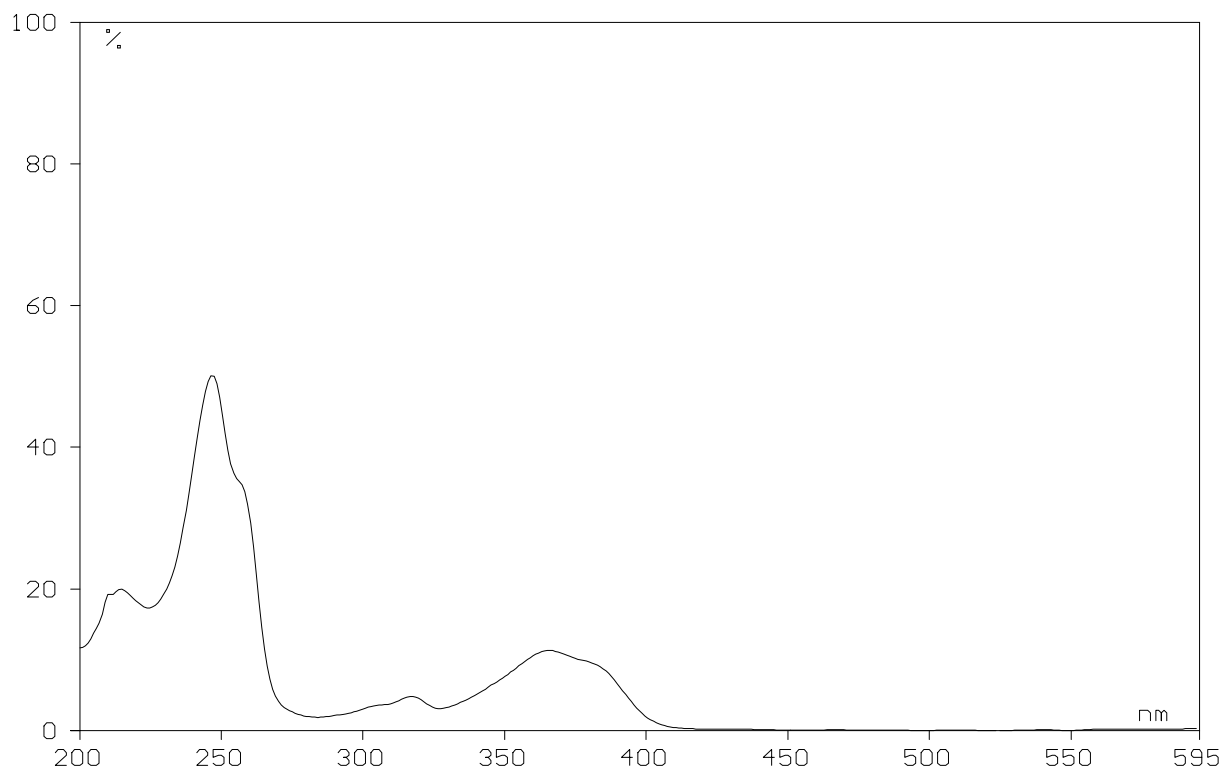
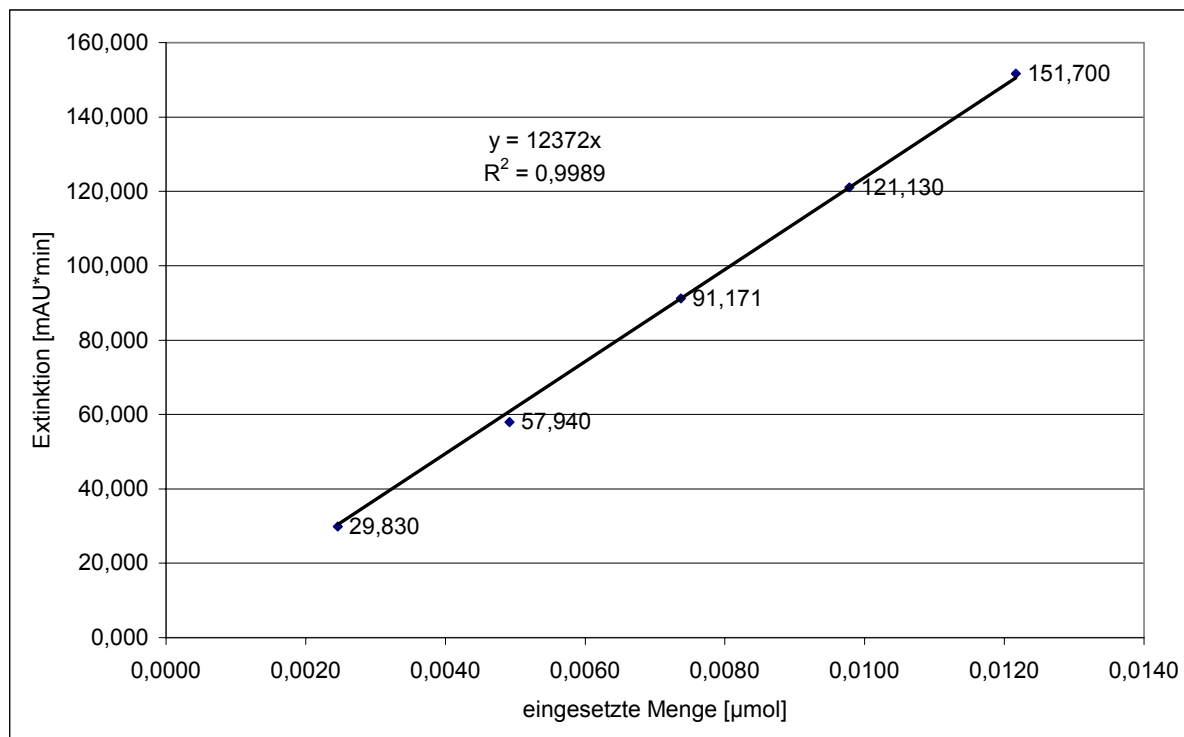
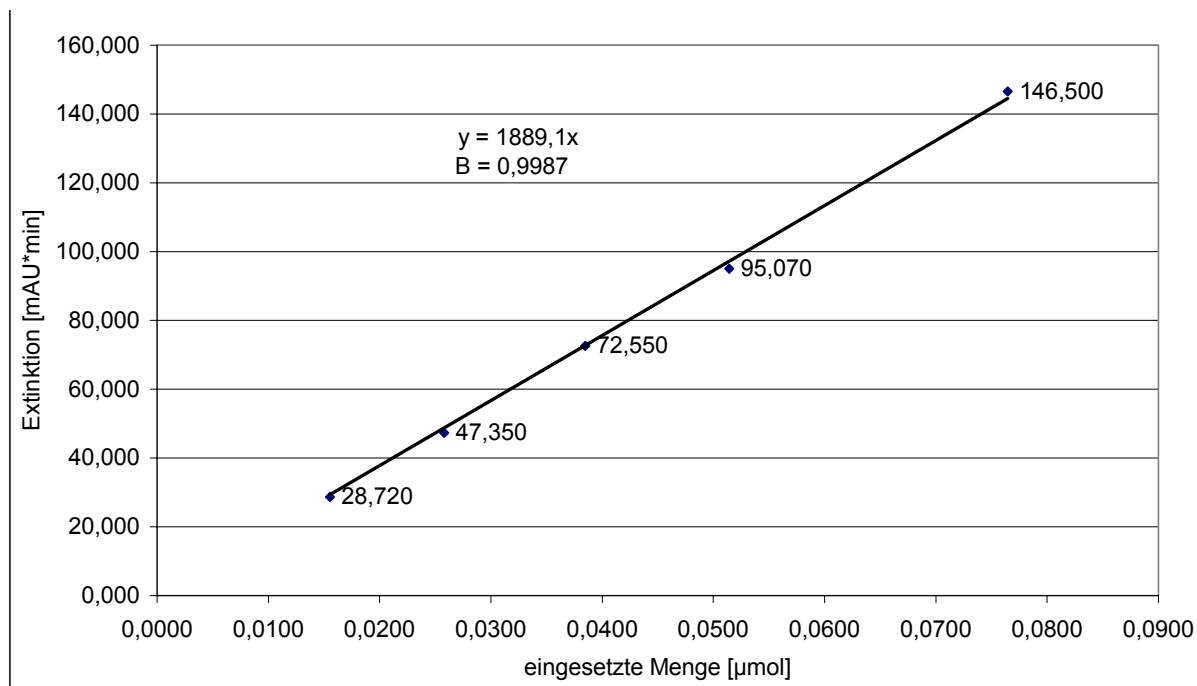
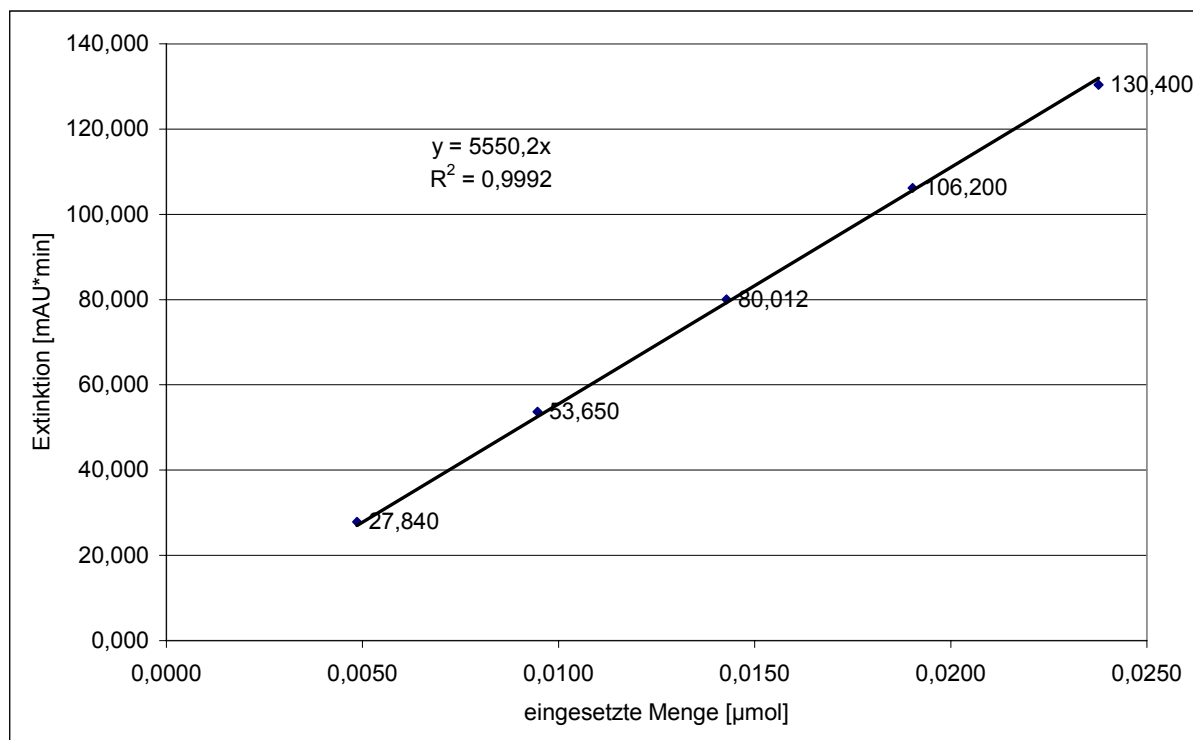
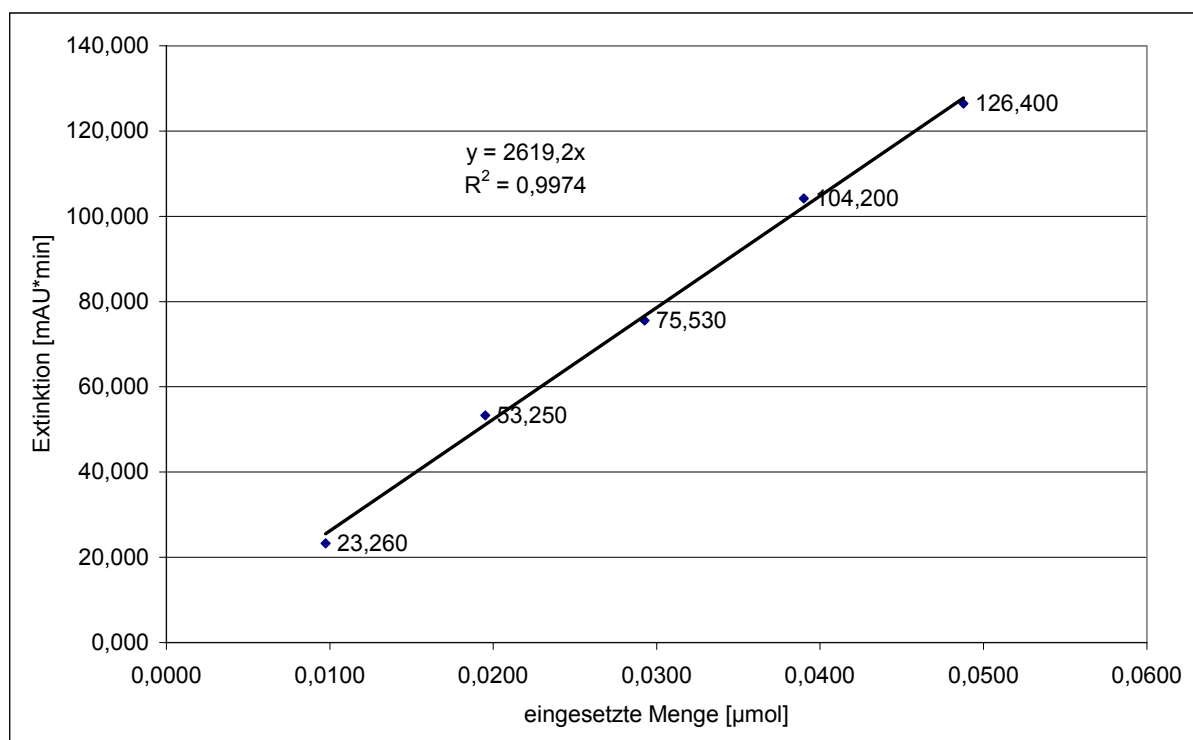
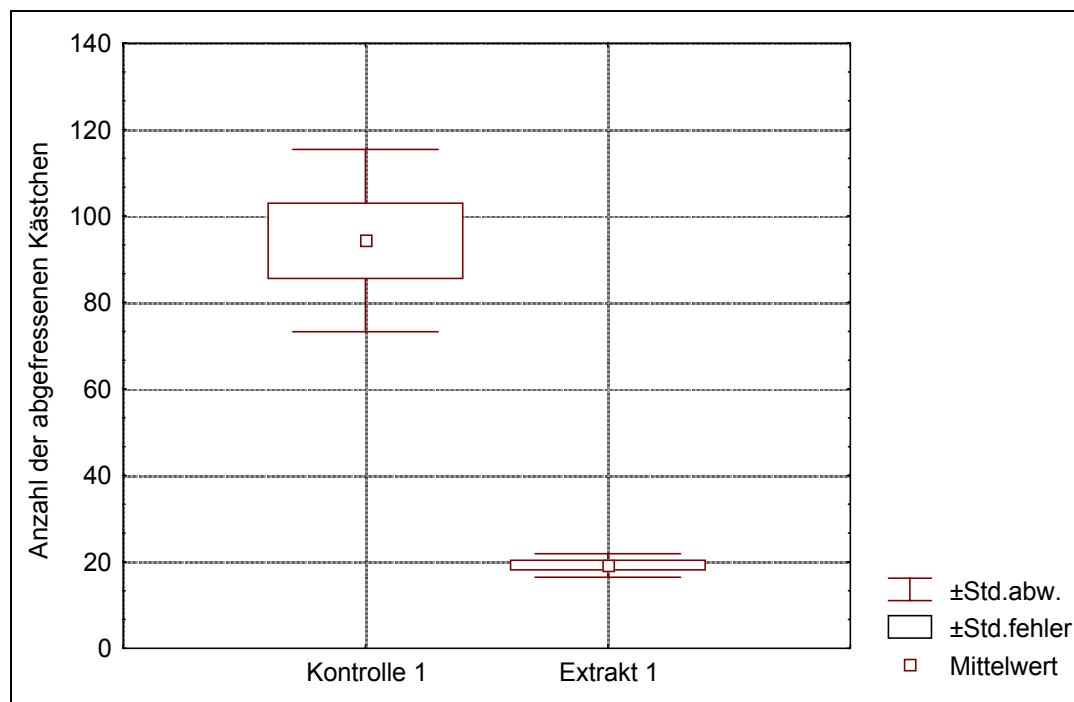
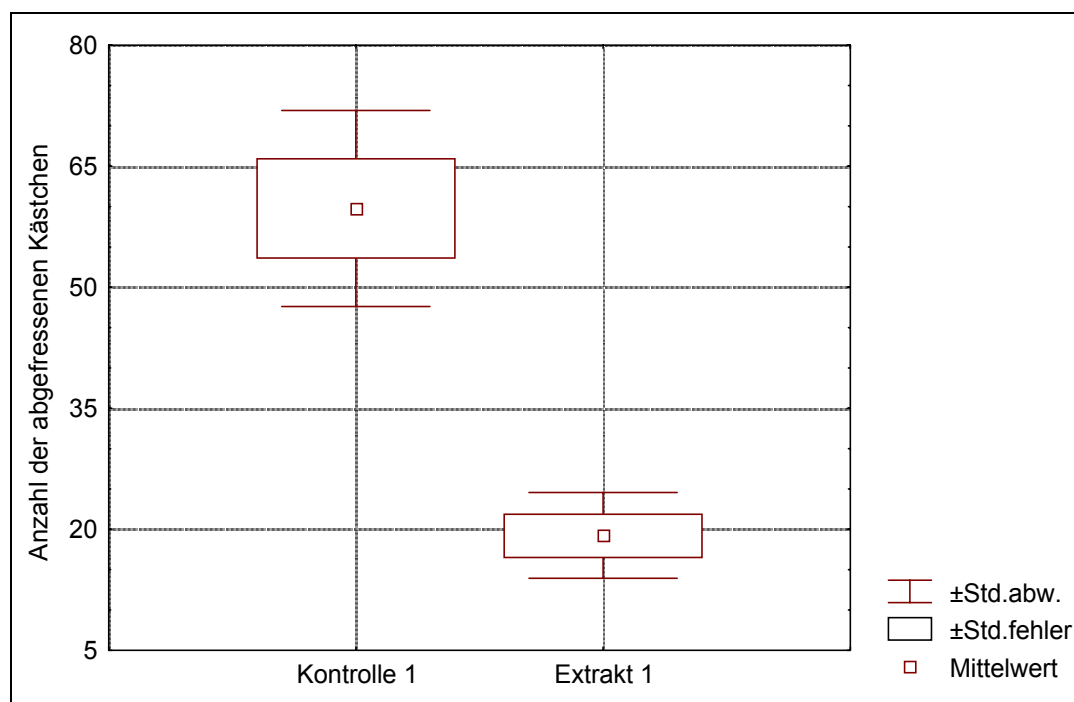


Abb.A.32.: UV-Spektrum des Dienons

**Abb.A.33.:** HPLC-Chromatogramm des Pigmentes**Abb.A.34.:** UV-Spektrum des Pigmentes

**Abb.A.35.:** Eichgerade des Aerothionins**Abb.A.36.:** Eichgerade des Aeroplysinin-1

**Abb.A.37.:** Eichgerade des Dienons**Abb.A.38.:** Eichgerade des Dienons

**Abb.A.39.:** 1. Fütterungsversuch mit Aerothionin (n=6)**Abb.A.40.:** 2. Fütterungsversuch mit Aerothionin (n=4)

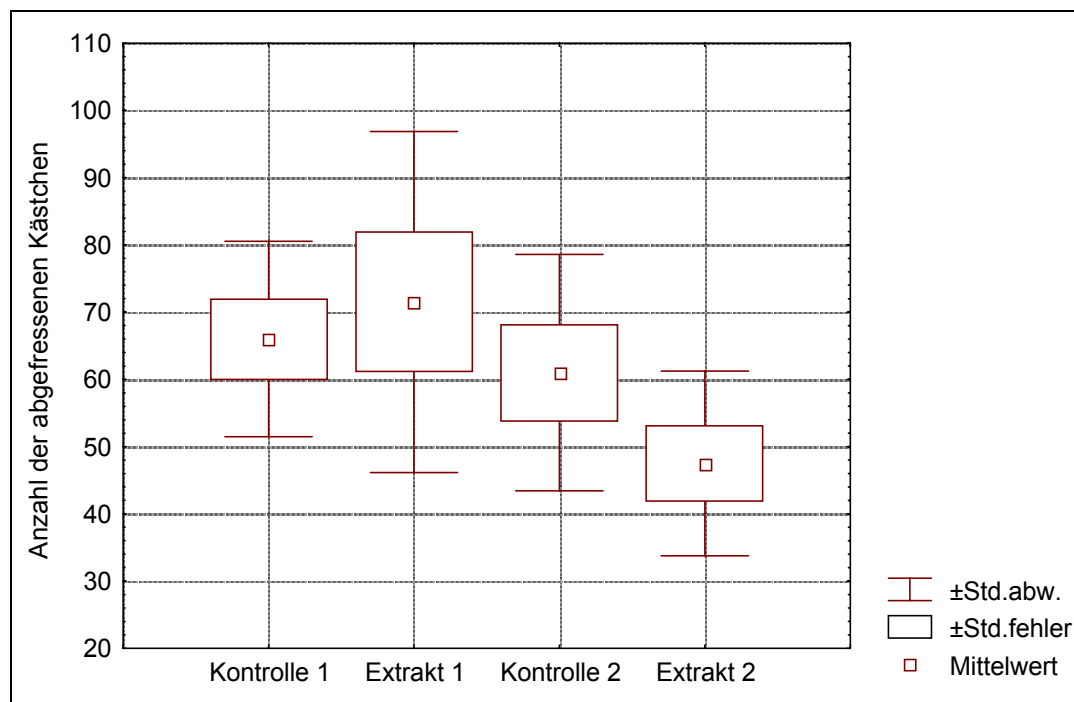


Abb.A.41.: Zwei Fütterungsversuche mit Aeroplysinin-1 in der Konzentration im ethanolkonservierten Schwamm (n=6)

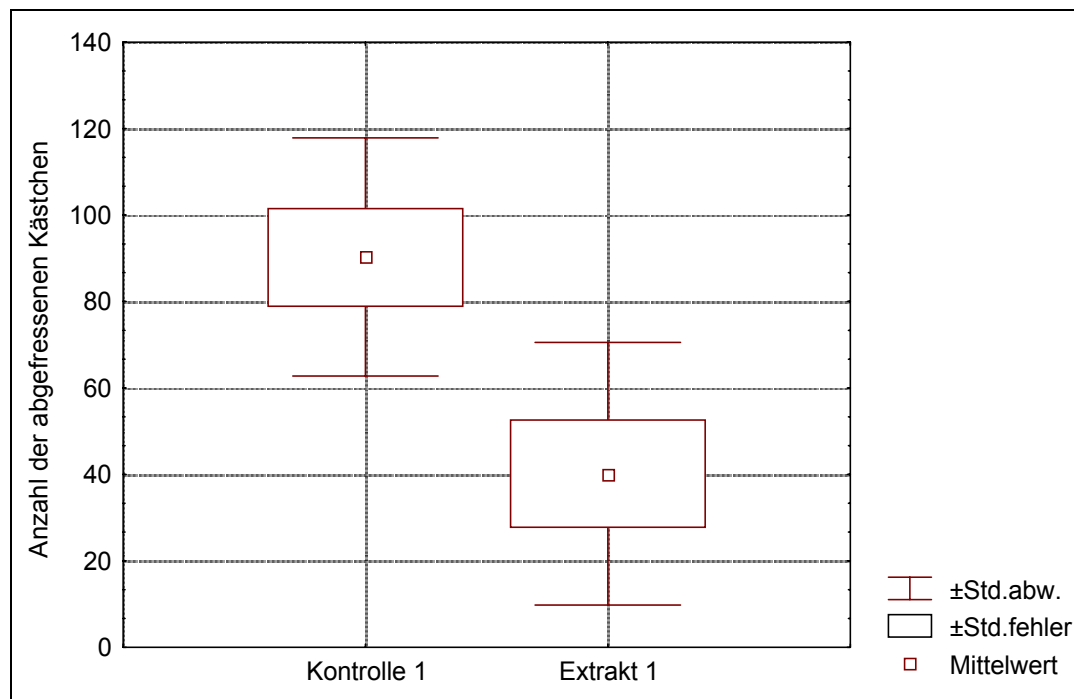


Abb.A.42.: Fütterungsversuch mit Aeroplysinin-1 in der Konzentration des Dienons im ethanolkonservierten Schwamm (n=6)

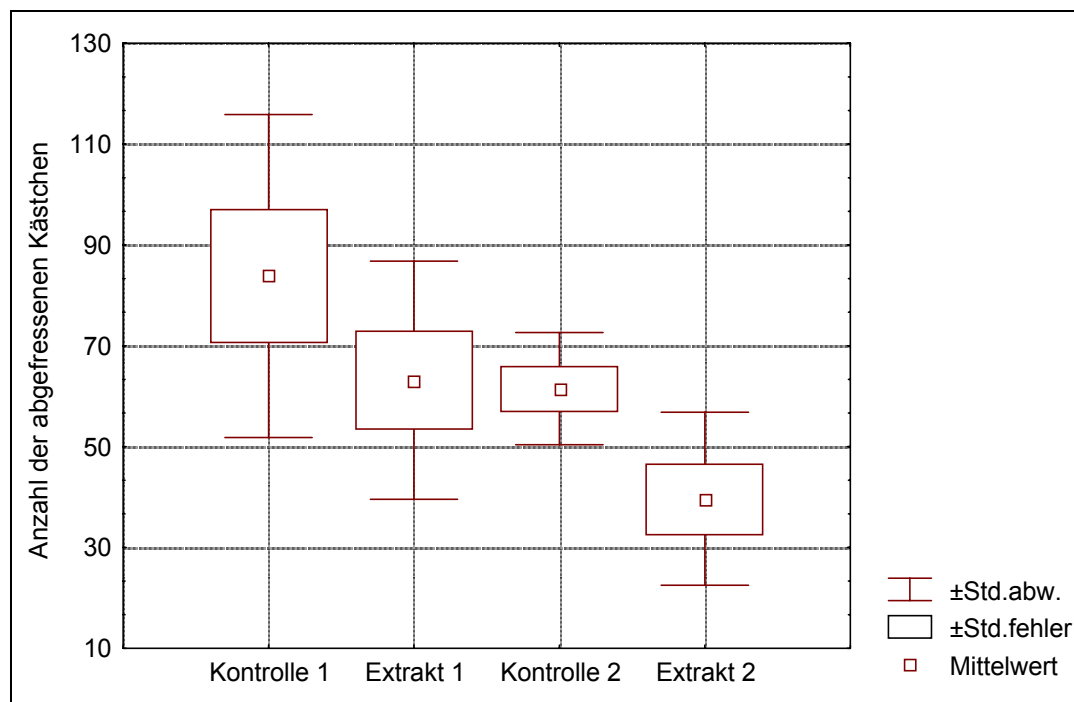


Abb.A.43.: Zwei Fütterungsversuche mit Dienon in der Konzentration im ethanolkonservierten Schwamm (n=6)

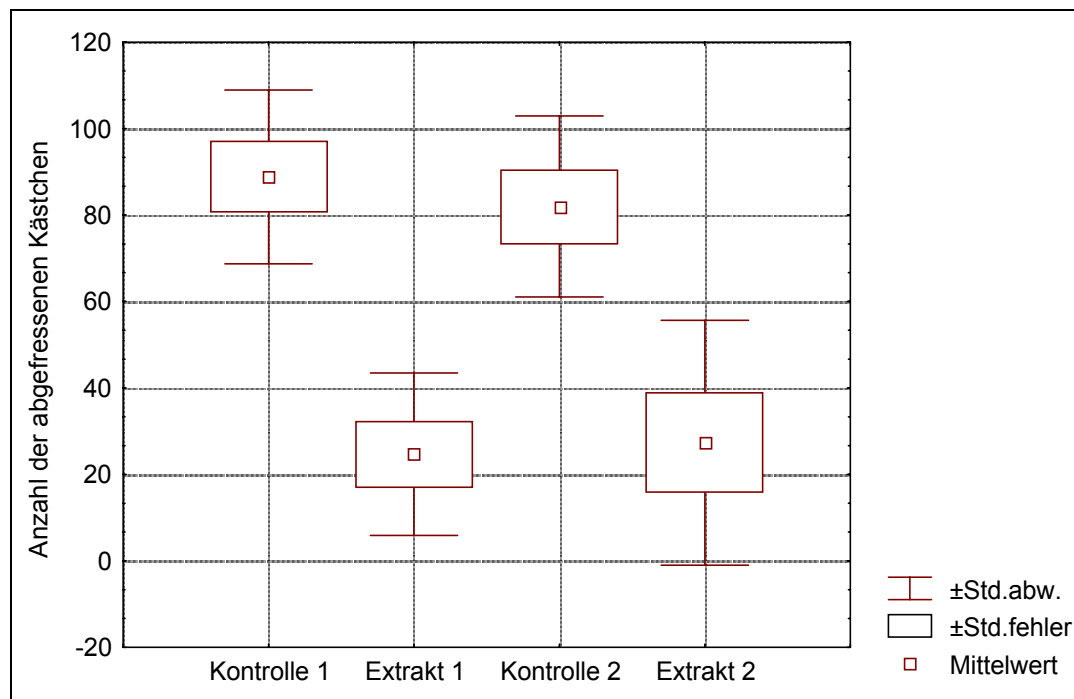


Abb.A.44.: Zwei Fütterungsversuche mit dem Pigment; Versuch 1 in der Konzentration im ethanolkonservierten Schwamm; Versuch 2 im eingefrorenen Gewebe (n=6)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur fraßhemmenden Aktivität von Schwamminhaltsstoffen gegenüber Fischen“ selbständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 31.12.2000