

LIPIDBIOMARKER SCHWAMMASOZIIERTER  
BAKTERIEN UND ARCHAEEN

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich  
Geowissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Thomas Pape

aus Bremervörde

Hamburg, 2004

Als Dissertation angenommen vom Fachbereich Geowissenschaften der Universität Hamburg

auf Grund der Gutachten von Prof. Dr. Walter Michaelis  
(Universität Hamburg)  
und Prof. Dr. Volker Thiel  
(Universität Göttingen)

Hamburg, den 14.01.2004

Prof. Dr. H. Schleicher  
Dekan  
des Fachbereichs Geowissenschaften

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am *Institut für Biogeochemie und Meereschemie* der Universität Hamburg im Rahmen des BMBF-finanzierten Projektes ‚BOSMAN – Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle‘ unter Leitung von Herrn Professor Walter MICHAELIS durchgeführt. An erster Stelle möchte ich mich bei ihm für die Vergabe des interessanten Themas bedanken, das mir nicht nur Kenntnisse in der Organischen Geochemie und der Biochemie der Organismen vermittelte, sondern auch Einblicke in andere naturwissenschaftliche Disziplinen gewährte. Seine wissenschaftlich kompetenten Anregungen und seine Geduld haben erheblich zur Qualität der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Volker THIEL vom *Geowissenschaftlichen Zentrum* der Universität Göttingen danke ich für die hervorragende Einführung in organisch-geochemische Arbeitsmethoden, für die Weitergabe seiner Erfahrungen und Informationen sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gebührt weiterhin den Mitgliedern des Prüfungsausschusses, namentlich Herrn Prof. W. MICHAELIS, Herrn Prof. V. THIEL, Herrn Prof. C. BETZLER, Frau Prof. E.-M. PFEIFFER und Herrn Prof. U. SZEWZYK, die die Begutachtung dieser Arbeit angenommen haben.

Mein Studienkollege Dr. Martin BLUMENBERG bearbeitete in seiner Promotionsarbeit das in dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial mit schwammbezogenen Fragestellungen. Von ihm habe ich zahlreiche wertvolle Informationen und Anregungen erhalten. Für seine wissenschaftlichen Beiträge und die unzähligen begleitenden Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sowie für unsere langjährige freundschaftliche Verbundenheit möchte ich mich bei Martin bedanken.

Dr. Richard SEIFERT hat mich durch zahlreiche Anregungen und Ratschläge, für die ich mich an dieser Stelle bedanken möchte, unterstützt.

Sabine BECKMANN danke ich für die methodischen Tipps und für die Aufbereitung einiger Proben. Bei Michael HOLZWARTH danke ich mich besonders für die Unterstützung bei chemischen und massenspektrometrischen Verfahren und Interpretationen. Beiden Kollegen danke ich ferner, wie auch allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, für die angenehme Zusammenarbeit. Frank BOENKENDORF führte die Aufbereitung von Archaealipiden in einigen Schwämmen durch. Bei Gabriele THAL danke ich mich herzlich für das sorgfältige Redigieren der Arbeit.

Grundlage der vorliegenden Arbeit war ein umfangreicher Fundus diverser Schwämme, der ohne die exzellente Unterwasserarbeit von Jürgen SCHAUER und Karen HISSMANN vom JAGO-Team des *Max-Planck-Instituts für Verhaltensphysiologie*, Seewiesen, nicht zu Stande gekommen wäre. Der Einsatz des Kapitäns und der Mannschaft der Forschungsfahrt POSEIDON 254 sorgten für die Voraussetzungen. Weiteres wertvolles Schwammmaterial wurde von Dr. Shirley A. POMPONI und John REED der *Harbor Branch Oceanographic Institution*, Florida, zur Verfügung gestellt.

Für die Versorgung mit Bakterienkultivaten und Informationen danke ich Dr. Ingeborg GRAEBER, Ines KAESLER und Tatjana FRITSCHER der Arbeitsgruppe Prof. U. SZEWZYK vom *Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen* der TU Berlin. Dr. Friederike HOFFMANN vom *Geowissenschaftlichen Zentrum* der Universität Göttingen danke ich für die Bereitstellung zahlreicher mikrobiologischer Daten und für die gute Zusammenarbeit. Ebenso sei ihr und Hans-Tore RAPP vom *Institute of Fisheries and Marine Biology* der Universität Bergen, Norwegen, für die hervorragende Organisation unseres Forschungsaufenthaltes an der *Marin-Biologisk-Station* in Espeland gedankt. Die hierfür benötigten Finanzmittel wurden vom EU-Programm ‚Improving Human Research Potential‘ bereitgestellt.

Bei Susanne SÖLTER, Karsten FEHLER und Sven POSSNER vom Arbeitskreis Prof. W. FRANCKE vom *Institut für Organische Chemie* der Universität Hamburg danke ich mich für die chemisch-technischen Hilfestellungen. Für die Einweisung in hydrochemische Messverfahren und die Durchführung von Analysen danke ich Dr. Nikolaj DELLING, Max NELLEN, Dr. Ralf LENDT, Dr. Axel HUPE und Dr. Sabine BRASSE vom *Institut für Biogeochemie und Meereschemie* sowie Ilse BÜNS und Monika SCHÜTT vom *Institut für Organische Chemie, Abteilung für Organomeereschemie*, der Universität Hamburg.

Schließlich danke ich meiner Familie für ihre Liebe, ihr Verständnis und die notwendigen Ablenkungen von der Wissenschaft.

## Abstract

Sponges (class porifera) are considered to be the earliest metazoans. Various sponge species are known to host dense populations of specific microorganisms which may contribute significantly to the total biomass (Vacelet, 1975). Sponge-microbe associations constructed reef buildings during various episodes of the earth history (Brunton & Dixon, 1994; Riding & Zhuravlev, 1995). Thus, the characterisation of the source organisms and the diagenetic fate of molecular cell constituents of sponges are of great interest. Recent studies have shown, that sponges and/or associated microorganisms are prominent producers of so-called secondary metabolites (Pawlik, 1993; Haygood et al., 1999). However, since the majority of microbes eluded isolation so far, the discrete source organisms of biotechnological interesting compounds often remain unknown. Although recent gene sequence surveys contributed much to the understanding of microbial compositions in sponges (Hentschel, 2002), specific prokaryotes occurring in low densities might not have been acquired.

The present thesis deals with the qualitative and semiquantitative characterisation of microorganisms associated with boreal sponges. Applying lipid biomarker analysis, the main objective of this work was to establish a data basis for the investigation of specific sponge-associated microorganisms and their constituents. About 50 species of the sponge classes Hexactinellida and Demospongiae of worldwide distributed cold and deep-water habitats were analysed for their inventory of lipids attributed to Archaea and Bacteria. The results of hydrochemical studies, which were performed simultaneously during the sampling of most demosponges, hint for annual stable water conditions at the mid Norwegian shelf.

For comparison, about 50 cultivates of sponge-associated bacteria affiliated to the proteobacteria or the firmicutes group were analysed with regard to fatty acids (FA).  $\alpha$ - and  $\gamma$ -proteobacteria predominantly synthesized saturated and monounsaturated linear  $C_{12}$ - to  $C_{19}$ -FA in genus specific distribution patterns, whereas terminal methylbranched FA prevail in the bacillus species. Various compounds, like hexadecenoic and octadecenoic acids were found in numerous bacterial taxa. In this study it was found, that the  $C_{16:1}/C_{18:1}$  ratio allows for a taxonomical assignment of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -proteobacteria.

Based on numerical analysis of bacterial FA in sponges, the traditional classification of bacteriosponges and non-bacteriosponges (*sensu strictu* Reiswig) was differentiated. In particular for demosponges it was observed, that the density of bacterial cells is linked to the habitus of the host organisms. With few exceptions vast amounts of bacterial FA were observed in species of various Demospongiae-families comprising high biomass and dense tissues respectively. For the sponges examined, it was found, that the  $n-C_{16:0}/n-C_{18:0}$  ratio might be used for an estimation of the bacterial density in sponge tissues.

All bacteriosponges comprise diverse FA and hopanoids often found in Gram-negative and -positive bacteria. Moreover, components presumably of bacterial origin or solely known from bacteria of other biotopes, were observed in partially high concentrations. In bacteriosponges complex isomeric mixtures of mid chain branched (mcb-)FA are prevailing. Regarding their structural peculiarities, relatives of sulfate-reducing  $\delta$ -proteobacteria,  $\beta$ - or  $\gamma$ -proteobacteria, or actinomycetes are assumed as source organisms of these components. The spatial distribution of the mcb-FA within the tissue of *Geodia barretti* signifies, that they are synthesized by (facultative) anaerobic bacteria. Since mcb-FA are regarded as features of evolutionary primitive bacteria, the pronounced presence of these compounds may mirror the coevolution of sponges and associated bacteria. Moreover, compound

specific analysis of stable carbon isotopes for *G. barretti* indicated the utilisation of mcb-FA for the synthesis of “demospongiic acids”.

In bacteriosponges the appearance of non-isoprenoidal glycerol mono ether lipids suggests the presence of sulfate-reducing  $\delta$ -proteobacteria or clostridia while long chain dicarboxylic acids most probably originate from anaerobic clostridia. Thus several lipid classes indicate the presence of oxygen-depleted compartments within the tissues of these sponges.

For the first time the association between Archaea and numerous hexactinellids and several demospongiae was established by lipid biomarker analysis. The distribution of etherbound acyclic biphytanes and homologues with up to three cycloalkylrings hints for the dominance of crenarchaeota. However, compared to the crenarchaeotal sponge symbiont *Cenarchaeum symbiosum* previously described (Preston et al., 1996, DeLong et al. 1998), a higher relative abundance of the acyclic biphytanes was found in the sponges studied, suggesting an additional contribution by euryarchaeotes. Archaea were predominantly observed in sponges poor in bacteria. For the axinellid non-bacterio-sponge *Phakellia ventilabrum* the biomass of sponge-associated Archaea was estimated based on nominal cell weight. Compared with the bacterial cell density in *P. ventilabrum* calculated by others using DAPI staining and microscopic counting, it may be assumed that Archaea – though most probably existing in various sponge taxa – in *P. ventilabrum* constitute a relatively small fraction of sponge-associated microbial community.

The results of this thesis may serve as a basis for microbiological studies regarding the search for novel biotechnological interesting compounds. Lipid biomarker analysis proved to be an effective tool for a qualitative and quantitative evaluation of sponge-associated microorganisms. Using this concept specific endobiotic groups like Archaea, clostridia, sulfate-reducing proteobacteria or actinomycetes, which lack profound documentation so far, were detected in the sponges investigated. Thus, the relevance of the biomarker analysis of sponges for the specific search for secondary metabolites could be evidenced.

# Inhalt

Danksagung

Abstract

Definitionen und Abkürzungen

<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Schwamm-Mikroorganismen-Assoziationen</b> .....	1
<b>1.2 Zielsetzung</b> .....	2
<b>2 Bacteria, Archaea und Porifera – Auftreten, Lipidchemismus und chemisch- ökologische Eigenschaften</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Allgemeine Merkmale der Prokaryota und Eukaryota</b> .....	5
2.1.1 Phylogenetische Klassifizierung .....	5
2.1.2 Ökologie .....	7
2.1.3 Membranlipide .....	7
<b>2.2 Die Bacteria</b> .....	10
2.2.1 Physiologische Merkmale und phylogenetische Klassifizierung .....	10
2.2.2 Membranlipide .....	12
<b>2.3 Die Archaea</b> .....	12
2.3.1 Physiologische Merkmale und phylogenetische Klassifizierung .....	12
2.3.2 Auftreten im marinen Milieu .....	14
2.3.3 Membranlipide .....	15
<b>2.4 Die Porifera</b> .....	16
2.4.1 Physiologische Merkmale .....	16
2.4.2 Erdgeschichtliches Auftreten und phylogenetische Klassifizierung .....	17
2.4.3 Membranlipide .....	18
<b>2.5 Gemeinschaften von Poriferen und Mikroorganismen</b> .....	19
2.5.1 Assoziationen mit Bacteria .....	19
2.5.2 Assoziationen mit Archaea .....	24
2.5.3 Schwammassoziierte Mikroorganismen als Produzenten von Sekundärmetaboliten .....	25
<b>3 Habitatanalyse des Sula-Rückens (Norwegen) und Beschreibung des Probenmaterials</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Habitatanalyse</b> .....	29
3.1.1 Ozeanographie und Meereschemie am Sula-Rücken .....	29
3.1.2 Allgemeine Geologie und Biologie des Sula-Rückens .....	33
<b>3.2 Das Probenmaterial</b> .....	35
3.2.1 Poriferen .....	35
3.2.2 Bakterien .....	36
3.2.3 Archaeen .....	39
<b>4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Phylogenie</b> .....	41
<b>4.2 Lipide</b> .....	42
4.2.1 Gesättigte <i>n</i> -Fettsäuren .....	44
4.2.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren .....	45
4.2.3 Zweifach ungesättigte Fettsäuren .....	48
4.2.4 Terminal methylverzweigte Fettsäuren .....	48
4.2.5 Mittkettig methylverzweigte Fettsäuren .....	49
4.2.6 Hydroxyfettsäuren .....	50
4.2.7 Hopanoide .....	51
<b>4.3 Diskussion</b> .....	52

<b>5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae</b> .....	<b>55</b>
<b>5.1 Kurzkettige Monocarbonsäuren (SCFA)</b> .....	56
5.1.1 Gesättigte <i>n</i> -Fettsäuren .....	63
5.1.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren .....	65
5.1.3 Zweifach ungesättigte Fettsäuren .....	67
5.1.4 Terminal methylverzweigte Fettsäuren .....	68
5.1.5 Mittkettig methylverzweigte Fettsäuren .....	70
5.1.6 Cyclopropylfettsäuren .....	73
5.1.7 3-Methylfettsäuren .....	74
5.1.8 Dimethylfettsäuren .....	75
5.1.9 2-Methoxyfettsäuren .....	76
<b>5.2 Langkettige Dicarbonsäuren (DCA)</b> .....	77
<b>5.3 Nichtisoprenoide Glyceroletherlipide</b> .....	84
5.3.1 Monoalkylglycerolether .....	85
5.3.2 Plasmalogene .....	90
<b>5.4 Hopanoide</b> .....	95
<b>5.5 Gattung <i>Geodia</i> – Zusammenhang zwischen der Mikrobiologie, den ökologischen Parametern und der Verteilung bakterieller Fettsäuren in <i>Bakterienschwämmen</i></b> .....	104
5.5.1 Phylogenie der Bakterien in <i>G. barretti</i> – Synopse lipidchemischer und mikrobiologischer Untersuchungen .....	105
5.5.2 Mittkettig methylverzweigte SCFA als Vorläuferkomponenten von mcb-, demospongiac acids <sup>1</sup> ? .....	106
5.5.2.1 Auftreten spezifischer mcb-FA .....	106
5.5.2.2 Signaturen stabiler Kohlenstoffisotope ausgewählter Fettsäuren .....	108
5.5.3 Zusammenhang zwischen der mcb-SCFA-Verteilung und den O <sub>2</sub> -Gehalten im Gewebe von <i>G. barretti</i> .....	109
5.5.4 Verteilung der mcb-SCFA in Phospholipiden aus <i>G. macandrewii</i> .....	114
<b>5.6 Zusammenfassende Diskussion des bakteriellen Lipidinventars</b> .....	118
<b>6 Archaeenlipide in Hexactinellida und Demospongiae</b> .....	<b>123</b>
<b>6.1 Einleitung</b> .....	123
<b>6.2 Freie und ethergebundene Isoprenoide</b> .....	125
6.2.1 Freie Isoprenoidkohlenwasserstoffe – Pentamethyleicosan und Lycopan .....	125
6.2.2 Ethergebundene Isoprenoide – Phytan und Biphytane .....	126
<b>6.3 Zusammenfassende Diskussion der Lipide aus Archaea</b> .....	128
<b>7 Erweiterte Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>131</b>
<b>8 Literatur</b> .....	<b>135</b>

## Anhang

### A Verzeichnisse

I Abbildungen

II Tabellen

### B Probenmaterial

I Verzeichnis der Poriferen

II Verzeichnis der Bakterien

III Ausgewählte, in der Literatur beschriebene schwammassoziierte Prokaryota

IV Ausgewählte Mikroorganismen mit relevanten Lipidbiomarkern

### C Methoden

I Hydrochemie

II Lipidchemie

III Verwendete Chemikalien

### D Ergebnisse

I Physiko- und hydrochemische Daten im Gebiet des Sula-Rückens (POS 254, Sommer 1999)

II Fettsäurezusammensetzung in Isolaten schwammassoziiierter Bakterien

III Verteilung der SCFA in Demospongiae

IV Verteilung der SCFA in Hexactinellida

V Gewichtsverhältnisse SCFA/LCFA sowie Anteile der SCFA am FA-Inventar in Demospongiae

### E Massenspektren Biphytane

## **F Publikationen**

### mit direktem Bezug zur vorliegenden Arbeit

Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., **Pape T.**, Pomponi S. A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., and Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften*, **89**, 60-66.

**Pape T.**, Blumenberg M., Thiel V., and Michaelis W., (2004) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. *Bollettino dei Musei e degli Istituti biologici dell'Università di Genova* (accepted).

### mit erweitertem Bezug zur vorliegenden Arbeit

Blumenberg M., Thiel V., **Pape T.**, and Michaelis W., (2002) The steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften*, **89**, 415-419.



## Definitionen und Abkürzungen

Neben den gebräuchlichen Kürzeln und Strukturformeln wurden in dieser Arbeit folgende Abkürzungen verwendet

Abb.	Abbildung
$\alpha$ -, $\beta$ -	Substituent an C-2 bzw. C-3 positioniert (von der funktionellen Gruppe gezählt)
Ac	Acetat
AOM	Anaerobe Oxidation von Methan
amu	Atommasseneinheiten (Molekulargewicht)
BHT	Bakteriohopantetrol
$C_n$	Anzahl n der Kohlenstoffatome in einer Verbindung
$C_{n:0}$	gesättigte Verbindung mit n Kohlenstoffatomen
$C_{n:x}$	ungesättigte Verbindung mit n Kohlenstoffatomen und x = Anzahl der Doppelbindungen
$C_{40\ 0} \dots C_{40\ III}$	Biphytane (reguläre $C_{40}$ -Isoprenoide) mit null bis drei nicht linearen Alkyleinheiten
cy	interne Cyclopropylverzweigung einer Verbindung
$\Delta^n$	bezeichnet in Molekülen Doppelbindungen, die zwischen C-Atom n und n+1 lokalisiert sind
$\delta^{13}C$	$^{13}C:^{12}C$ -Isotopenverhältnis; $\delta^{13}C [‰] = [(R_{Probe}-R_{Standard})/R_{Standard}] \times 1000$
D-	Demospongiae-Spezies
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dicarbonsäuren
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff (dissolved inorganic carbon)
DiME	Dimethylester bzw. -derivat
DMDS	Dimethyldisulfid
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
DPG	Diphosphatidylglycerol (,Cardiolipin')
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECD	Elektroneneinfangdetektor (Electron-Capture-Detector)
EI	elektrische Ionisierung
FA	Fettsäure (fatty acid) bzw. Fettsäurefraktion
FAME	Fettsäuremethylester (fatty acid methyl esters)
FID	Flammenionisationsdetektor (Flame-Ionisation-Detector)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GBV	Gelbettvolumina
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie
GC-IRMS	Gaschromatograph(ie) gekoppelt mit Massenspektrometer zur Vermessung der Verhältnisse stabiler Isotope (GC-isotope ratio mass spectrometer)
GC-MS	Gaschromatograph(ie) gekoppelt mit Massenspektrometer(metrie)
H-	Hexactinellida-Spezies
h	Stunde(n)
<i>i/ai</i>	<i>iso</i> bzw. <i>anteiso</i> ; Methylverzweigung an den Position $\omega 2$ bzw. $\omega 3$
ID	Innendurchmesser
IRMS	isotope ratio monitoring system
IS	Interner Standard (bei der Gaschromatographie)

konz.	konzentriert
KW	Kohlenwasserstoffe
LCFA	langkettige Fettsäuren $> C_{19}$ (long chain fatty acid)
M	Mol
MAGE	Monoalkylglyceroletherlipid(e)
mcb	mittkettig monomethylverzweigt (midchain branched)
ME	Methylester bzw. Methylester-Derivat(e)
MeO	Methoxy-Substituent
<i>m/z</i>	Verhältnis der Masse eines Fragmentions zu seiner Ladung
$M^+$	Masse des Molekularions in amu
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer, Massenspektrum
NAC	North Atlantic Current
NCC	Norwegian Coastal Current
NMR	Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phosphoglycerolipid
PLFA	in der Phospholipid-Fraktion gebundene Fettsäuren, (phospholipid bound fatty acid)
PME	Pentamethyleicosan (pentamethylicosane)
PS	Phosphatidylserin
r	Verhältnis
$R_f$	Retentionsfaktor; Quotient aus der Laufstrecke einer Substanz und der Laufmittelfront (bei der DC)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
$R_t$	Retentionszeit (retention time)
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationseinheit (Maß zur Abschätzung des Molekulgewichts bei der Gensequenzanalyse)
SAB	schwammassoziierte Bakterien
Sal	Salinität
SAM	schwammassoziierte Mikroorganismen (sponge associated microorganisms)
SCFA	kurzkettige Fettsäuren $\leq C_{19}$ (shortchain fatty acid)
SRB	Sulfat reduzierende Bakterien
sp.	Spezies
spp.	alle Spezies einer Gattung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIC	Gesamt-Ionenstrom (Total Ion Current)
T	Temperatur
v	Volumen
<i>vic</i>	<i>vicinal</i> , benachbart
$\omega$	Kohlenstoffatom eines Moleküls, an dem ein Substituent (eine Doppelbindung) lokalisiert ist. Kohlenstoffatome werden dabei von dem der funktionellen Gruppe gegenüberliegenden Ende gezählt.

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Schwamm-Mikroorganismen-Assoziationen

Die Klasse der Schwämme (Porifera) ist aufgrund einer Reihe einzigartiger Eigenschaften für viele wissenschaftliche Disziplinen von großem Interesse. Da Schwämme fossil bereits aus dem ausgehenden Proterozoikum dokumentiert sind, ihre Ursprünge sehr wahrscheinlich jedoch deutlich früher (mittleres Proterozoikum) datieren, gelten sie als die ältesten Metazoa. Rezent ist das Phylum hinsichtlich Artenzahl – zur Zeit sind etwa 7000 Spezies bekannt – und Biomasse ein hervortretendes Faunenelement des marinen Benthos (HOOPER und VAN SOEST, 2002). Obwohl Poriferen hinsichtlich ihres Aufbaus recht einfach strukturiert sind, beinhalten sie ein außergewöhnliches Spektrum an organischen Komponenten, die oftmals von höheren Organismen nicht bekannt sind. Neben einer Vielzahl unterschiedlicher Zellmembranlipide, wie divers strukturierter Steroide und Fettsäuren, sind eine Reihe komplexer Metaboliten aus Schwämmen bekannt (BERGQUIST *et al.*, 1984; DJERASSI und LAM, 1991; DJERASSI und SILVA, 1991; FAULKNER, 2002).

Zahlreiche mikrobiologische Studien zeigen, dass in der interzellulären Matrix zahlreicher Schwammspezies dichte Populationen teilweise sehr spezifischer Mikroorganismen auftreten, die im Individuum bis zu 40 % der Biomasse des Gesamtorganismus stellen können (VACELET, 1975). Neuere Untersuchungen weisen weiterhin die Anwesenheit assoziierter Archaeen im Gewebe einiger Exemplare nach (PRESTON *et al.*, 1996; WEBSTER *et al.*, 2001a; MARGOT *et al.*, 2002). Verschiedene Schwämme können somit hoch diverse Biozönosen darstellen, an denen Vertreter aller phylogenetischer Domänen – Eukarya, Bacteria und Archaea – beteiligt sind. Hinsichtlich der geringen Porifera-Entwicklung in der Erdgeschichte wird vermutet, dass die mikrobiellen Endobionten ursprüngliche Vertreter ihrer Phyla sind, die an die Bedingungen in der Schwammatrix angepasst sind (LOPEZ *et al.*, 1999).

Schwamm-Mikroben-Gesellschaften traten in vielen erdgeschichtlichen Phasen des Phanerozoikums als starke Riffbildner auf (BRUNTON und DIXON, 1994). Zahlreiche mesozoische Relikte der Gemeinschaften finden sich beispielsweise in Bereichen des Tethys-Nordrandes im oberen Jura Süddeutschlands. Die Charakterisierung der Quellorganismen und des diagenetischen Schicksals molekularer Zellbestandteile aus fossilen und rezenten Poriferen ist daher von großem Interesse für das Feld der Organischen Geochemie.

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen insbesondere für Spezies aus Flach- bzw. Warmwasserhabitaten, dass Poriferen oder ihre prokaryotischen Assoziaten zu den potentesten Produzenten pharmakologisch aktiver Verbindungen zählen (HAYGOOD *et al.*, 1999; CAPON, 2001). Diese sog. Sekundärmetaboliten weisen z.B. zytotoxische, antimikrobielle oder antitumorale Wirkungen auf und übernehmen demzufolge vermutlich essentielle Funktionen für das Schwamm-Mikroben-Ökosystem. Zur Zeit werden bereits einige diskrete Verbindungen therapeutisch eingesetzt bzw. befinden sich in späten Phasen der klinischen Prüfung. Mit wenigen Ausnahmen sind aber die synthetisierenden Zellen – Schwamm- oder Mikroorganismen – der Sekundärmetaboliten nicht geklärt. Weiterhin ist in den letzten Jahren allgemein die Untersuchung kälteangepasster Prokaryoten, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, zunehmend in das Blickfeld biotechnologisch orientierter Forschung gerückt. Es hat sich beispielsweise gezeigt, dass durch die Nutzung

## 1 Einleitung und Zielsetzung

---

bestimmter Enzymsysteme solcher Mikroorganismen der Energieumsatz bei verschiedenen industriellen Anwendungen erheblich gesenkt werden konnte (SELLEK und CHAUDHURI, 1999; CAVICCHIOLI *et al.*, 2002). Für eine kommerzielle Nutzung biologisch aktiver Komponenten ist daher die Erforschung unbekannter mariner Mikroorganismen und ihrer Syntheseleistungen von besonderer Bedeutung.

Wenngleich in den letzten Jahren neue mikrobiologische Verfahren erheblich zur Identifizierung unbekannter Prokaryoten in verschiedenen Habitaten geführt haben, ist das Wissen um die Zusammensetzung des mikrobiellen Inventars sowie die ökologische Funktion spezifischer Prokaryoten in Schwämmen noch sehr lückenhaft. Es hat sich gezeigt, dass konventionelle mikrobiologische Methoden für eine umfassende Aufklärung des mikrobiellen Inventars in Schwammgeweben infolge ihrer hohen Spezifität oder des vergleichsweise hohen Aufwandes nicht ausreichend sind.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Untersuchung mikrobieller Lipidbiomarker als wenig aufwändiges und sehr aussagekräftiges Verfahren zur qualitativen und semiquantitativen Charakterisierung schwammassoziiierter Mikroorganismen (SAM) in Tief- und Kaltwasserschwämmen eingesetzt. Als Biomarker („biologische Marker“) werden organische Verbindungen angesehen, deren Ursprung auf individuelle Organismen(gruppen) zurückgeführt werden kann. Von großer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang verschieden strukturierte und funktionalisierte, die Zytoplasmamembranen konstituierende Membranlipide. Da ihre Grundgerüste oft über geologische Zeiträume stabil sind, werden Biomarker auch als molekulare Fossilien bezeichnet. Sowohl in fossilen als auch in rezenten Proben eignen sich Biomarker zur chemotaxonomischen Charakterisierung autochthoner Organismen-Gemeinschaften und allochthoner organischer Einträge.

### 1.2 Zielsetzung

Im Rahmen des vom BMBF geförderten Projektes „Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle – BOSMAN“ wurden Kaltwasserschwämme mit dem bemannten Tauchboot „JAGO“ vom Korallenriffkomplex am Sula-Rücken auf dem mittelnorwegischen Tiefschelf gesammelt. Schwammassoziierte Bakterien wurden hier von Kollegen der Mikrobiologie aus ausgewählten Exemplaren kultiviert. Erweitert wurde der Probenfundus bei einer Sammlungskampagne während eines Aufenthaltes an der *Marin-Biologisk-Station* der Universität Bergen, Norwegen, sowie durch Bereitstellung von im Atlantik und Pazifik mit Tauchbooten geborgener Schwämme des *Harbor Branch Oceanographic Institutions*, Fort Pierce, Florida.

An etwa 50 Kalt- bzw. Tiefwasserschwämmen der Klassen Hexactinellida und Demospongiae sowie mit ihnen vergesellschafteter Bakterien wurden in der vorliegenden Arbeit mit Methoden der Biomarkeranalyse folgende wissenschaftlichen Fragestellungen bearbeitet:

- Sind qualitative und quantitative Unterschiede des Inventars prokaryotischer Endobionten in Poriferen verschiedener phylogenetischer Zuordnung vorhanden?
- Welche Bakterientaxa können mit Hilfe der Biomarkeranalyse im Endodermalgewebe von Poriferen bestimmt werden?
- Wie groß ist der Anteil individueller Bakteriengruppen an der SAM-Gemeinschaft?
- Sind Aussagen zu den ökologischen Funktionen von SAM möglich?
- Sind Archaeen Bestandteil der mikrobiellen Population im Probenmaterial? Welchen Taxa sind schwammassoziierte Archaeen zuzuordnen?
- Sind seltene oder unbekannte Lipidbiomarker potenziell mikrobiellen Ursprungs mit paläontologischer Relevanz im Gewebe von Schwämmen vorhanden?

Zur Klärung dieser komplexen Themenschwerpunkte stand ein hinsichtlich der Biodiversität und Unversehrtheit einzigartiges Probenmaterial in ausreichender Masse zur Verfügung. Die Zuordnung der Quellorganismen von Lipiden im Schwammgewebe wurde durch die Untersuchung zahlreicher Isolate schwammassoziierter Bakterien begünstigt. Als vorteilhaft für die Analyse mikrobieller Lipide hat sich zudem die Herkunft der Poriferen aus überwiegend aphotischen Tiefenzonen erwiesen, da diese im Vergleich zu Flachwasserschwämmen einem geminderten Eintrag saisonal auftretender phototropher Mikroorganismen ausgesetzt sind. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Zusammensetzung des Materials aus geographisch weit gestreuten Standorten die Charakterisierung von mit individuellen Schwammphyla vergesellschafteten Mikroorganismenpopulationen ermöglichte.

Die vorliegende Arbeit wurde nach verschiedenen Themenkomplexen gegliedert. **Kapitel 2** umfasst eine allgemeine Beschreibung der physiologischen Merkmale und lipidchemischen Eigenschaften relevanter Organismen sowie eine Übersicht über Schwamm-Mikroorganismen-Assoziationen. Das **Kapitel 3** beschäftigt sich mit der Charakterisierung der hydrographischen, geologischen und biologischen Situation am Sula-Rücken sowie der Beschreibung der gewonnenen Schwamm- und Bakterienproben. Die Ergebnisse lipidchemischer Untersuchungen an etwa 50 Kultivaten von isolierten Bakterien aus Demospongiae sind in **Kapitel 4** dargestellt. Diese Daten wurden zur Zuordnung von Lipidbestandteilen zu ihren Quellorganismen – Schwamm- oder Bakterienzelle – in Schwämmen genutzt. Die Beschreibung und Diskussion einer Vielzahl bakterieller Lipide in den untersuchten Poriferen findet sich in **Kapitel 5**. Die Ergebnisse einer substanzspezifischen Untersuchung der bakterienreichen Gattung *Geodia* werden gemeinsam mit den mikrobiologischen Befunden anderer Arbeitsgruppen ebenfalls in diesem Kapitel detailliert diskutiert. Das **Kapitel 6** ist der zusammenfassenden Diskussion von Archaeen als Bestandteil der mikrobiologischen Population in Hexactinellida und Demospongiae gewidmet. Die abschließende Diskussion der Arbeit findet sich in **Kapitel 7**.

## **1 Einleitung und Zielsetzung**

---

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Charakterisierung der allgemeinen Prokaryoten-Dichte, zur Erfassung der Phylogenie und Ökologie unbekannter assoziierter Prokaryota-Taxa sowie zur Aufklärung neuer mikrobieller Lipidbiomarker in Schwämmen. Die semiquantitative Inventarisierung der Lipide ermöglichte eine detaillierte Differenzierung zwischen bakterienreichen und bakterienarmen Schwämmen. Die gewonnenen lipidchemischen Daten können zur gezielten mikrobiologischen Suche nach biotechnologisch interessanten Bakterien und Archaeen in Schwämmen genutzt werden. Weiterhin können die Untersuchungsergebnisse zur Differenzierung der Quellorganismen von Lipiden unbekannter Herkunft in verschiedenen rezenten und fossilen Substraten hilfreich sein.

## 2 Bacteria, Archaea und Porifera – Auftreten, Lipidchemismus und chemisch-ökologische Eigenschaften

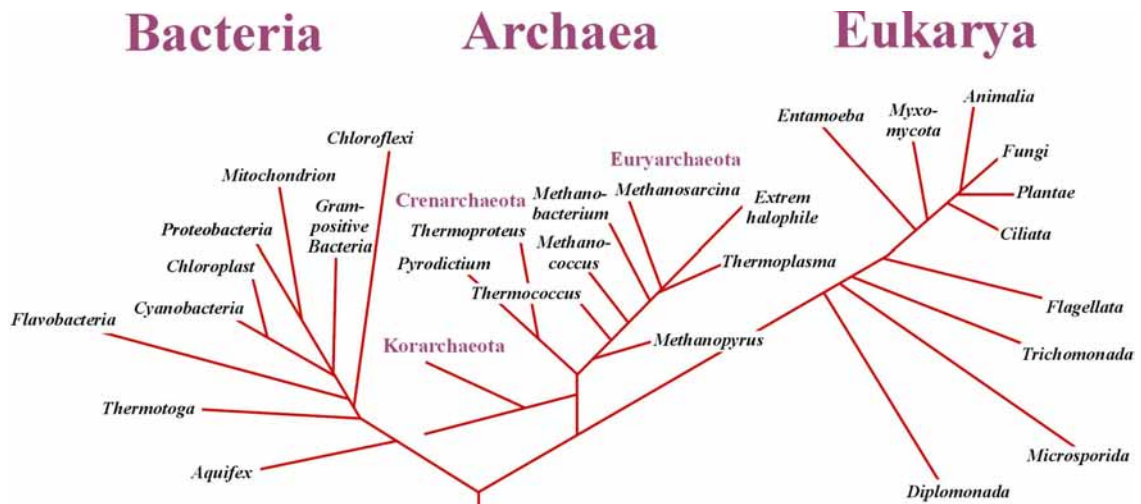
Porifera sind erdgeschichtlich sehr früh auftretende Animalia, von denen viele Spezies hohe Anteile an mikrobieller Biomasse beinhalten. Der Gesamtorganismus kann in solchen Fällen durchaus als Agglomerat eukaryotischen und prokaryotischen Zellmaterials angesehen werden. In Bezug zu den Ergebnissen dieser Arbeit wird im Folgenden auf die Evolution und Ökologie der Eukaryota im Allgemeinen und der Porifera im Speziellen sowie auf die in ihnen beobachteten Mikroorganismen eingegangen werden. Die Befunde basieren im Wesentlichen auf lipidchemischen Analysen, so dass ebenfalls die biochemischen Grundlagen der jeweiligen Organismen dargestellt werden. Zur qualitativen und semiquantitativen Charakterisierung der Mikroorganismen in Porifera wurden für individuelle Taxa diagnostische Lipid-Biomarkerklassen genutzt, deren strukturelle Zusammensetzung vorgestellt wird.

### 2.1 Allgemeine Merkmale der Prokaryota und Eukaryota

#### 2.1.1 Phylogenetische Klassifizierung

Prinzipiell werden zwei Organismengruppen, die Prokaryota und die Eukaryota, hinsichtlich ihrer zytologischen Merkmale unterschieden. Während die eukaryotischen Zellen (Eucyten) einen durch eine Membran abgegrenzten Nukleus besitzen, der die Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid, DNA) enthält, fehlt dieser den prokaryotischen Zellen (Protocyten). In Protocyten liegt die DNA stattdessen in Form eines ringförmig geschlossenen Strangs als Kernäquivalent, dem Nukleoid, frei im Zytoplasma. Die von Eucyten bekannte Kompartimentierung durch Organellen, wie den Mitochondrien oder Plastiden, ist ferner in Protocyten nur geringfügig ausgeprägt. Ein weiteres strukturelles Unterscheidungskriterium ist die Zellgröße; der Zelldurchmesser der Eucyte ist allgemein etwa zehnfach größer als der der Protocyte. Im Gegensatz zu den Eukaryota sind alle Prokaryota einzellige Organismen.

Durch die Resultate molekularbiologischer Verfahren wurde die traditionelle Ansicht, dass Organismen prinzipiell den Bacteria (inklusive Archaea) oder den Eukaryota zuzuordnen sind, revidiert. Auf der Grundlage vergleichender Sequenzanalysen der ribosomalen Ribonukleinsäure (ribosomal ribonucleic acid, rRNA) schlossen WOESE und FOX (1977) und WOESE *et al.* (1990), dass die Gruppe der Archaea als eigenständige Domäne neben den Bacteria und Eukarya (analog Eukaryota) zu klassifizieren ist (Abb. 2.1). Ein gemeinsamer Vorfahr aller Organismen, die Progenote, gilt dabei als sehr wahrscheinlich (WOESE, 1987).



**Abbildung 2.1** Phylogenetisches System der Biosphäre basierend auf vergleichenden rRNA-Analysen (MADIGAN *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse paläontologischer und molekularbiologischer Analysen legen die Vermutung nahe, dass die phylogenetische Diversifizierung der Pro- und Eukaryota erdgeschichtlich bereits sehr früh stattfand. Während für die auf etwa 3,5 Mrd. Jahre datierten frühesten Mikrofossilien ein prokaryotischer Ursprung wahrscheinlich ist (SCHOPF, 1993), wurde für die ersten eukaryotischen Fossilien ein Alter von etwa 2,1 Mrd. Jahre festgestellt (HAN und RUNNEGAR, 1992). Jedoch ist aufgrund des in 2,7 Mrd. Jahre alten Depositionen beobachteten Vorkommens von Steranen, die sich von komplexen, typischerweise in eukaryotischen Zellen auftretenden Sterolen ableiten, die frühe Entwicklung dieser Domäne ebenfalls im Archaikum sehr wahrscheinlich (BROCKS *et al.*, 1999).

Der Ursprung und die der frühen Evolution der Eukarya zugrunde liegenden Prozesse sind weniger erforscht, und verschiedene Entwicklungsszenarien wurden vorgestellt. Während das traditionelle ‚Archaea‘-Modell die direkte Entstehung der Eukarya aus Eocyten (eine Gruppe hyperthermophiler, Schwefel umsetzender Archaeen) bzw. aus einem gemeinsamen Vorfahren vorschlägt (GOGARTEN *et al.*, 1989; IWABE *et al.*, 1989; WOESE *et al.*, 1990), führten insbesondere die mikrobiologischen Beobachtungen syntropher Konsortien in den letzten Jahrzehnten zur Formulierung des Fusionsmodells. Nach Letzterem ist die Eukaryogenese aus der metabolischen Symbiose von Archaeen und Bakterien hervorgegangen (GUPTA und BOLDING, 1996; MARTIN und MÜLLER, 1998). Die an der Syntrophie beteiligten Prokaryota sind weiterhin Gegenstand der Diskussion, in der mehrere mögliche Kombinationen in Betracht gezogen werden. Als mögliche Partner werden z.B. methanogene Archaeen und Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobacteria (MOREIRA und LÓPEZ-GARCIA, 1998), Vertreter der Thermoplasmata und der Spirochaetes (MARGULIS, 1996) oder – weniger spezifisch – Gram-negative Bakterien und Eocyten (GUPTA und BOLDING, 1996) genannt. Unabhängig von der Natur der Eukaryogenese wurde interessanterweise festgestellt, dass Eocyten bzw. Archaea im Allgemeinen die nächsten prokaryotischen Verwandten der Eukarya sind (IWABE *et al.*, 1989; RIVERA und LAKE, 1992; BALDAUF *et al.*, 1996). Vor etwa 1,0 bis 0,7 Mrd. Jahren fand dieser Übergang von vermutlich kolonialen Protozoa zu den Metazoa statt (CONWAY MORRIS, 1993; XIAO *et al.*, 1998; MÜLLER und MÜLLER, 1999).



### 2.1.2 Ökologie

Beide Domänen der Prokaryota treten vermutlich ubiquitär in der Geosphäre auf, und von beiden sind sowohl autotrophe als auch heterotrophe Formen bekannt. Experimentelle Studien zeigen, dass insbesondere Angehörige der Bakterien zur mixotrophen Ernährung veranlagt sind. Der Energiegewinn autotropher Prokaryota erfolgt entweder phototroph oder chemotroph. Prokaryota mit C-heterotropher Ernährung sind allgemein befähigt, diverse chemische Substrate umzusetzen. Somit spielen diese Organismen aufgrund ihrer vielfältigen metabolischen Fertigkeiten und ihrer Verbreitung eine wesentliche Rolle in den Stoffkreisläufen der Geosphäre.

Die Eukarya dagegen sind, von Ausnahmen abgesehen, aerobe Organismen. Diese werden in die vier Reiche der Fungi, der Plantae, der Animalia (Tiere) sowie der paraphyletischen Gruppe der Protista (Einzeller) gegliedert. Die Protista umfassen dabei u.a. die in Abb. 2.1 gezeigten Gruppen der (Ent)amoeba, Myxomycota, Ciliata, Flagellata, Trichomonada, Mikrosporidien und Diplomonada. Auch bei den Eukaryoten sind Auto- und Heterotrophie vertreten. Die Animalia sind *per definitionem* heterotroph und umfassen im Wesentlichen die Metazoa, zu denen auch die Porifera gehören.

Vielfach bestehen Assoziationen zwischen höheren Organismen und Prokaryota (s. Kapitel 2.5), wobei Letztere bezüglich ihrer Ökologie den Saprophyten, Parasiten oder Symbionten zugeordnet werden. Häufig ist zwar der experimentelle Nachweis der ökologischen Ausprägung einer Assoziation problematisch, jedoch gibt es vielfach Hinweise, dass die Beziehungen symbiotischer Natur sind.

### 2.1.3 Membranlipide

Zur groben Klassifizierung werden Prokaryota im Allgemeinen, entsprechend der Anfärbbarkeit ihrer Zellwände, nach der Methode von Gram in die Gram-positiven und Gram-negativen Organismen unterteilt. Die Untersuchung einzelner in der Zelle auftretender Substanzklassen führt demgegenüber zu deutlich genaueren Aussagen über die phylogenetische Position eines Lebewesens.

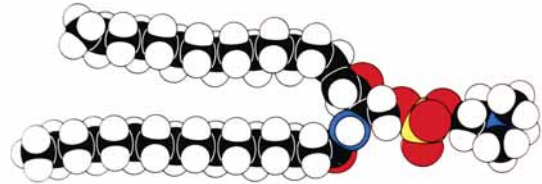
In den Zellen aller Organismen stellen DNA, RNA, Proteine und Phospholipide die wesentlichen Bestandteile. Diese sind essentiell für die Entwicklung und das Wachstum der Zelle und werden auch als primäre Naturstoffe oder kurz als Primärstoffe zusammengefasst. Die für diese Arbeit interessanten Lipide sind mit Anteilen zwischen 1 und maximal 10 % an der prokaryotischen Zelltrockenmasse vertreten (z.B. HENDERSON *et al.*, 1993; GABRIEL und CHONG, 2000). Lipide sind ein heterogenes Gemisch organischer Verbindungen, deren Gemeinsamkeit ihre lipophilen Eigenschaften sind. Diese sind im Wesentlichen in den Zytoplasmamembranen (Zellmembranen), die ein Teil der die Zelle stabilisierenden Zellwand sind und das Zytoplasma umgeben, lokalisiert. Die Zytoplasmamembranen grenzen das Zytoplasma gegen die Umgebung ab und enthalten, neben verschiedenen Proteinen, zwischen 70 und 90 % der Zelllipide. In der Eucyte umgeben weitere Membranen einige der Organellen. Bei verschiedenen Bakterien sind intrazytoplasmatische Membranen (bei phototrophen Bakterien) oder äußere Membranen (bei Gram-negativen Bakterien) ausgebildet.

Die Hauptkomponenten der Lipidfraktionen in den Zytoplasmamembranen aller Organismen ähneln sich generell in ihrem strukturellen Aufbau. Üblicherweise sind zwei lipophile Kohlenstoffketten und ein hydrophiler Bestandteil, die so genannte ‚Kopfgruppe‘, mit einem Glycerolgrundkörper verknüpft. Der überwiegende Teil der Kohlenstoffketten ist, meist paarweise, durch eine

## 2 Bacteria, Archaea und Porifera

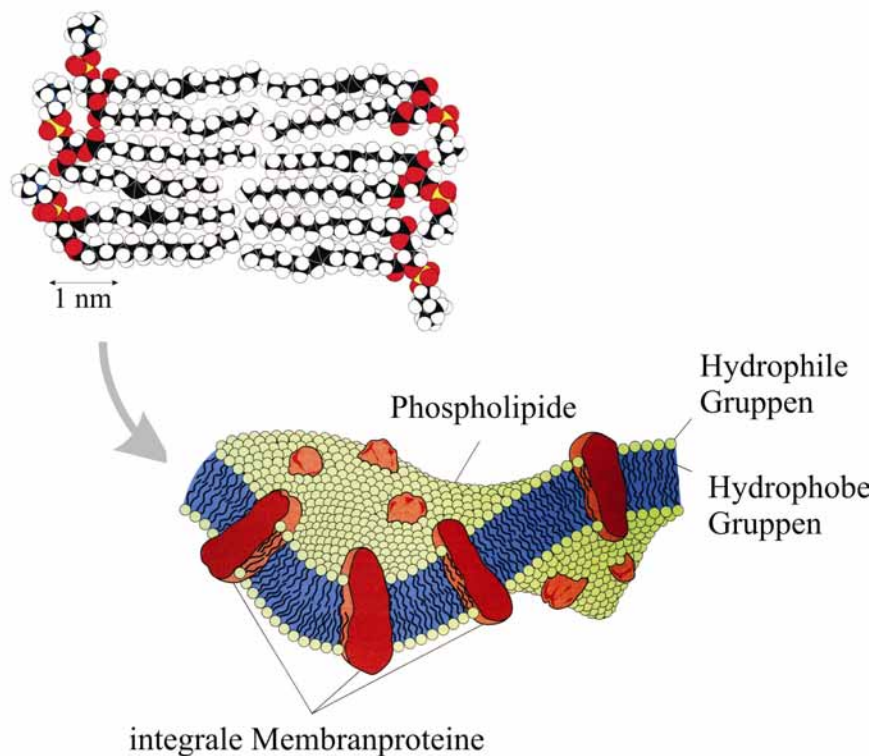
von drei grundsätzlichen Bindungsformen – als Acylester, als Vinylether oder als Alkylether – an das Glycerinmolekül gebunden. Während bei den Eukaryoten und Bakterien in der Regel Diacylglyceroldiester-Lipide („Diester-Lipide“) und selten Vinylether-Lipide auftreten, sind Dialkylglyceroldiether-Lipide („Diether-Lipide“) typische Membranbestandteile von Archaeen. Die Kopfgruppe besteht beispielsweise entweder, wie bei den quantitativ hervortretenden Phospholipiden (Abb. 2.2), aus Phosphatresten oder, wie bei den Glycolipiden, aus Kohlenhydratresten.

In der Zytoplasmamembran liegen sich in der Regel je zwei der amphiphilen Phospholipidmoleküle mit den hydrophoben Bestandteilen zueinander ausgerichtet gegenüber, so dass die so genannte Lipiddoppelschicht (bilayer) ausgebildet wird (Abb. 2.3). Die hydrophilen Bestandteile liegen an den Oberflächen der Membran. Hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals- bzw. Coulombsche Kräfte zwischen den Kohlenstoffketten sowie Wasserstoffbrücken zwischen den hydrophilen Bestandteilen stabilisieren die Membran.



**Abbildung 2.2**

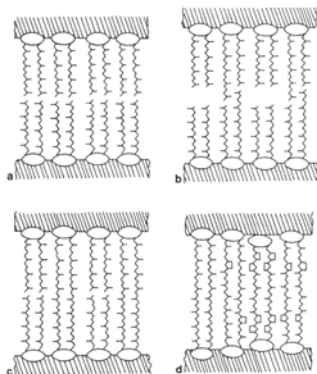
Kalottenmodell eines Phospholipidmoleküls.



**Abbildung 2.3** Schematischer Aufbau von Lipiddoppelschichten und biologischen Membranen (leicht verändert nach STRYER, 1995; MADIGAN *et al.*, 1997).

Die Zelllipide der Eukarya und der Bacteria bestehen überwiegend aus Diacylglycerolestern. Die Acylreste bestehen meist aus Carbonsäuren, die in *sn*-1,2-Konfiguration mit dem Glycerolmolekül verknüpft sind (Abb. 2.4). Archaea synthetisieren dagegen Alkylglycerolether-Lipide, in denen Isoprenoidalkohole an C-2 und C-3 des Glycerols (*sn*-2,3) gebunden sind.

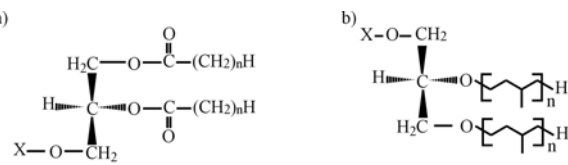
Von vielen thermophilen und acidophilen Archaeen werden Dialkyldiglyceroltetraether-Lipide (‘Tetraetherlipide’) synthetisiert. Die aus diesen Komponenten aufgebaute Lipideinzelschicht (‘monolayer’, Abb. 2.5) verleiht der Membran – ebenso wie interne Cyclisierungen der Alkylreste (s. Kapitel 6) – eine vergleichsweise höhere Rigidität (GLIOZZI *et al.*, 1983b; THOMPSON *et al.*, 1992).



**Abbildung 2.5** Schematischer Aufbau der Einzelschicht- bzw. Doppelschichtmembranen in Archaea  
 a) extrem halophile, b) alkalophile,  
 c) methanogene und  
 d) thermoacidophile Archaea  
 (DE ROSA *et al.*, 1991).

spezifische Membranfunktionen wie Ionentransport, Kommunikation und Energieübertragung. Steroide und Hopanoide sind cyclische Triterpene, die vermutlich stabilisierende und weitere, die Eigenschaften der Membran beeinflussende Funktionen ausüben. Während Steroide in allen Eukaryoten und sehr wenigen Bakterien gefunden werden, sind Hopanoide von vielen Bakterien bekannt (s. Kapitel 5.4).

Bei der Wachstumstemperatur eines Organismus liegen die Lipide in einem flüssigkristallinen Zustand vor, so dass essentielle Stofftransporte durch die Membran ermöglicht werden und konstante Bedingungen im Zytoplasma gewährleistet sind. Es ist bekannt, dass viele Prokaryota einen hohen Toleranzbereich gegenüber Zustandsänderungen der Umgebung besitzen. Als Reaktion auf geänderte Milieubedingungen (z.B. pH, Temp., Salinität, Substratverfügbarkeit) werden oftmals strukturelle Modifikationen der Membranlipide, wie die verstärkte/verringerte Synthese ungesättigter oder methylverzweigter Acylreste oder ein zunehmendes/abnehmendes Verhältnis von Diether- zu Tetraetherlipiden, beobachtet (RUSSELL, 1984; 1990). Prokaryoten gleicher Spezies können aus diesem Grund strukturell verschieden zusammengesetzte Membranlipide besitzen. Bei einer vergleichenden lipidchemischen Analyse von Mikroorganismen aus natürlichen Habitaten und aus Laborkulturen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, sind daher ihre Wachstumsbedingungen zu berücksichtigen.



**Abbildung 2.4** Strukturen von  
 a) *sn*-1,2-Diacylglycerolester-Lipiden und  
 b) *sn*-2,3-Dialkylglycerolether-Lipiden;  
 X = z.B. Phosphorylrest.

In diesem Fall können zwei verschiedene Kopfgruppen am Molekül substituiert sein, so dass z.B. Glycophospholipide entstehen. Die Ausbildung einer quervernetzten Zytoplasmamembran mit vergleichsweise hoch resistenten Tetraetherlipiden ermöglicht es verschiedenen Taxa, extreme Lebensräume zu besiedeln (RUSSELL und FUKUNAGA, 1990), wird aber auch in phylogenetisch nahen Verwandten moderater Milieubedingungen beobachtet.

Neben den Glyceriden sind in den Zellen der verschiedenen Organismen üblicherweise weitere gering- bis mittelmolekulare Komponenten wie ungebundene, vergleichsweise einfach strukturierte Komponenten, aber auch Proteine, Steroide und Hopanoide in die Zytoplasmamembran eingelagert. Integrale Proteine durchspannen die Lipiddoppelschicht und erfüllen

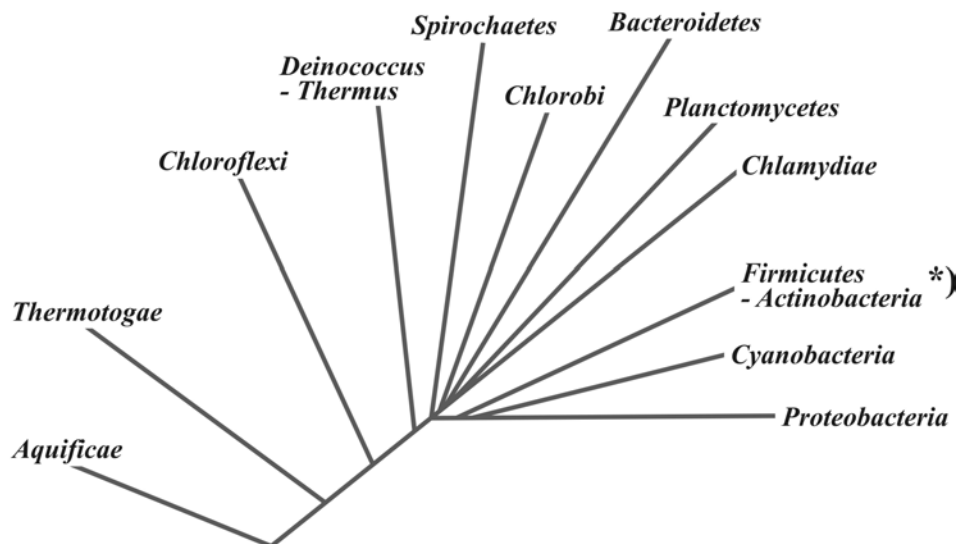
## 2.2 Die Bacteria

### 2.2.1 Physiologische Merkmale und phylogenetische Klassifizierung

In der Domäne der Bacteria (früher Eubacteria) werden Prokaryoten zusammengefasst, die sich als Gruppe phylogenetisch von den Archaea abgrenzen. Dabei unterscheiden sich die Struktur der bakteriellen Zellwand und die damit verbundene Zusammensetzung der Zytoplasmamembran von denen der Archaeen.

Bakterien sind physiologisch vielseitige Prokaryota mit ubiquitärer Verbreitung. Sie spielen daher eine wesentliche Rolle für die Stoffkreisläufe in der Geosphäre. Nach Schätzungen von KARNER *et al.* (2001) befinden sich im globalen Ozean  $3,1 \times 10^{28}$  bakterielle Zellen. Hinsichtlich ihrer typischen Zelldimensionen von etwa 0,2–5,0  $\mu\text{m}$  gehören die meisten Bakterien zur Fraktion der Mikroorganismen. Aufgrund ihrer außerordentlichen Vielfalt werden verschiedene Eigenschaften zur Klassifizierung von Bakterien genutzt, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

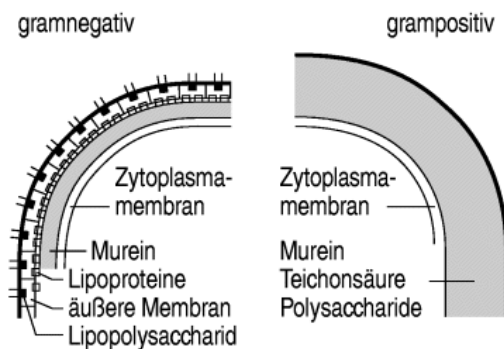
Mindestens 23 Phyla der Bakterien werden zur Zeit klassifiziert (GARRITY *et al.*, 2001). In Abb. 2.6 sind die wichtigsten Phyla und ihre phylogenetischen Beziehungen dargestellt.



**Abbildung 2.6** Phylogenetischer Stammbaum der Bacteria (leicht verändert nach MADIGAN *et al.*, 1997).  
\*) = Gram-positive Bakterien; alle weiteren Phyla Gram-negativ.

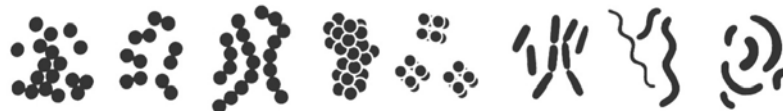
Verschiedene Merkmale wie die Komposition ihrer rRNA oder ihre Ökologie legten die Vermutung nahe, dass die hyperthermophilen *Aquificae* und *Thermotogae* ursprüngliche Bakterien-Phyla sind, die einem gemeinsamen Vorfahren sehr nahe stehen. Ebenfalls auf Grundlage der rRNA-Analyse wurden dagegen in einer kürzlich publizierten Studie Angehörige der *Planctomycetales* als früheste Bakterien vorgeschlagen (BROCHIER und PHILIPPE, 2002).

Die Zellwandstrukturen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien unterscheiden sich grundlegend. Während die Zellwand Gram-positiver Bakterien ein vielschichtiges Gerüst aus dem Peptidoglykan Murein (Zellwanddicke zwischen 20 und 80 nm) enthält, ist diese bei Gram-negativen Bakterien zwar deutlich dünner strukturiert (Dicke der Zellwand etwa 15 bis 20 nm), aber generell komplexer aufgebaut (Abb. 2.7). Die Mureinschicht Gram-negativer Bakterien grenzt unmittelbar an die Zytoplasmamembran und ist mit einer zweiten äußeren Phospholipiddoppelmembran, der so genannten äußeren Membran gekoppelt. Mit starken Anteilen liegen ferner Lipoproteine und Lipopolysaccharide in der Zellwand Gram-negativer Bakterien vor. Im Gegensatz dazu treten in Gram-positiven Bakterien verschiedene Polysaccharide auf, von denen die Teichonsäure ein charakteristisches Polymer dieses Zellwandtyps ist.



**Abbildung 2.7** Aufbau der Zellwand Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien (aus HILDEBRANDT *et al.*, 2001).

Die weiterführende Beschreibung von Bakterienstämmen erfolgt traditionell nach mikromorphologischen und physiologisch-biochemischen Merkmalen. Nach ihren äußeren Formen werden folgende Grundtypen bakterieller Zellen unterschieden: Kugeln (Mikrokokken, Diplokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Sarcinen), gerade Stäbchen (Bacillen), gekrümmte Stäbchen (Vibrionen) und Schraubenlinien (Spirillen) (Abb. 2.8). Andere Zellformen, die z.B. eine keulenförmige (coryneforme) Gestalt einnehmen können, sind bekannt.



**Abbildung 2.8** Formen bakterieller Zellen (SCHLEGEL, 1992).

Als weitere in Kultur ermittelte deskriptive Eigenschaften werden die metabolischen Fertigkeiten wie z.B. die Art der C-Quelle und der Energieumsetzung sowie der O<sub>2</sub>-Bedarf und verwertbare Nährstoffe herangezogen. Weitere Parameter, die in diesem Zusammenhang angegeben werden, sind die Wachstumsoptima wie z.B. T, pH und Salinität. Zur phylogenetischen Klassifizierung von Bakterien wird dagegen die Zusammensetzung der genetischen Materie (z.B. der rRNA) aufgenommen. Auch auf Grundlage der mit dieser Methode gewonnenen Daten wurden bis jetzt etwa 35.000 taxonomische Beschreibungen von Bakterien in der Datensammlung des *National Centers for Biotechnology Information (NCBI)* aufgenommen.

Vertreter der Bakterien mit diversen metabolischen Fähigkeiten sind aus nahezu allen marinen Bereichen bekannt, und die meisten marinen Mikroorganismen gehören zum Gram-negativen Zelltyp (MEYER-REIL, 1993). Mit diversen Gattungen sind die Cyanobakterien, die Proteobakterien (vorwiegend die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Subgruppe) und die Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides-Gruppe die am häufigsten auftretenden Phyla mariner Bakterien (GIOVANNONI *et al.*, 1990; BRITSCHGI und

GIOVANNONI, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1991; DELONG *et al.*, 1993; FUHRMAN *et al.*, 1993; COTTRELL und KIRCHMAN, 2000; EILERS *et al.*, 2001; KIRCHMAN *et al.*, 2001; BÉJÀ *et al.*, 2002). Weitere Arbeiten zeigen ferner eine deutliche Beteiligung von Actinobakterien an marinen Bakterienpopulationen (TAKIZAWA *et al.*, 1993; JENSEN und FENICAL, 1994; COLQUHOUN *et al.*, 1998).

### 2.2.2 Membranlipide

Die Gruppe der Bakterien synthetisiert strukturell sehr diverse Membranlipide. Die bakterielle Zytoplasmamembran setzt sich im Wesentlichen aus einer Doppelschicht verschiedener Klassen von Phospholipiden mit Esterbindungen zusammen (s. Kapitel 2.1.3). Wie auch bei den Eukaryoten ist bei bakteriellen Diacylglyceroldiester-Phospholipiden das Glycerolgerüst in *sn*-1,2-Konfiguration mit den Acylresten verknüpft. Die Acylreste bestehen wiederum aus einem weiten Spektrum verschiedenartiger Carbonsäuren in häufig für spezifische bakterielle Gruppen typischer Zusammensetzung (s. Kapitel 4). So werden in Bakterien in hohen Gehalten vor allem lineare oder methylverzweigte, gesättigte und einfach ungesättigte Carbonsäuren gefunden. Hydroxy- oder Cyclopropyl-substituierte Carbonsäuren treten ebenfalls häufig auf. Die chemotaxonomische Charakterisierung von Bakterientaxa auf Basis ihrer Lipidzusammensetzung, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, wird daher bereits seit langem an Kultivaten und natürlichen Proben angewandt.

Die von den Eukaryoten bekannten Steroide sind nur von vereinzelt methyloprophen Bakterien – *Methylococcus capsulatus* ( $\gamma$ -Proteobacteria) und *Methylobacterium organophilum* ( $\alpha$ -Proteobacteria) – in Form von 4-Methylsterolen bekannt (BIRD *et al.*, 1971; BOUVIER *et al.*, 1976; PATT und HANSON, 1978). Häufiger synthetisieren dagegen viele Bakterien Hopanoide, denen äquivalent zu den Steroiden eine membranstabilisierende Funktion zugesprochen wird (OURISSON *et al.*, 1979; ROHMER *et al.*, 1984; TAYLOR, 1984).

Interessant ist darüber hinaus das Vorkommen nichtisoprenoider ethergebundener Lipide in vornehmlich thermophilen und/oder phylogenetisch sehr tief stehenden Bakteriengruppen. Nichtisoprenoide Etherlipide wurden beispielweise in Aquificae (HUBER *et al.*, 1992), Thermotogae (DE ROSA *et al.*, 1988), Thermodesulfobacteria, Clostridia (LANGWORTHY *et al.*, 1983; LANGWORTHY und POND, 1986b) sowie Sulfat reduzierenden  $\delta$ -Proteobacteria (Rütters *et al.*, 2001; MICHAELIS *et al.*, 2002) festgestellt. Es wird vermutet, dass thermophile Bakterien Etherlipide aufgrund ihrer vergleichsweise höheren Stabilität synthetisieren (vgl. Kapitel 2.4.3 und 5.3).

## 2.3 Die Archaea

### 2.3.1 Physiologische Merkmale und phylogenetische Klassifizierung

Die Domäne der Archaea (früher Archaeobakterien) umfasst eine phänotypisch diverse Mikroorganismengruppe, die sich vor allem durch ihre genotypischen und lipidchemischen Eigenschaften sowohl von den Bakterien als auch von den Eukaryoten abgrenzt. Auf Grundlage der Sequenzhomologien ihrer rRNA wird ein gemeinsamer Vorfahr der Archaea, der generell den Eukaryoten näher als den Bakterien steht, vermutet (WOESE *et al.*, 1990).

Bis vor kurzem waren Archaea lediglich von Standorten extremer Bedingungen bekannt, so dass für sie lokal bis regional begrenzte Vorkommen angenommen wurden. Zunächst auf Grundlage gemeinsamer phänotypischer Merkmale wurden bereits recht früh die in ihrer Verbreitung hervortretenden Reiche der Euryarchaeota und der Crenarchaeota beschrieben: Die Euryarchaeota bilden eine physiologisch heterogene Gruppe, die vornehmlich methanogene, extrem halophile und extrem acidophile Mikroorganismen umfasst. Weiterhin sind einige hyperthermophile (Wachstums-optima etwa zwischen 80 und 105°C) Euryarchaeota, wie z.B. die Sulfat reduzierenden Archaeoglobales, bekannt (BURGGRAF *et al.*, 1990). In der Gruppe der Crenarchaeota wurden insbesondere (hyper)thermophile sowie acidophile oder neutrophile, Schwefel umsetzende, (hyper)thermophile Organismen (wie z.B. *Sulfolobus solfataricus*) zusammengefasst (z.B. WOESE, 1987; STETTER, 1996).

Neben diesen dominanten Reichen wurden die Korarchaeota anhand noch nicht kultivierter, vermutlich hyperthermophiler Organismen einer Thermalquelle klassifiziert (BARNES *et al.*, 1996; REYSENBACH *et al.*, 2000). In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde ferner das hyperthermophile *Nanoarchaeum equitans* kultiviert und als Typusart des neuen Reiches der Nanoarchaeota vorgeschlagen (HUBER *et al.*, 2002).

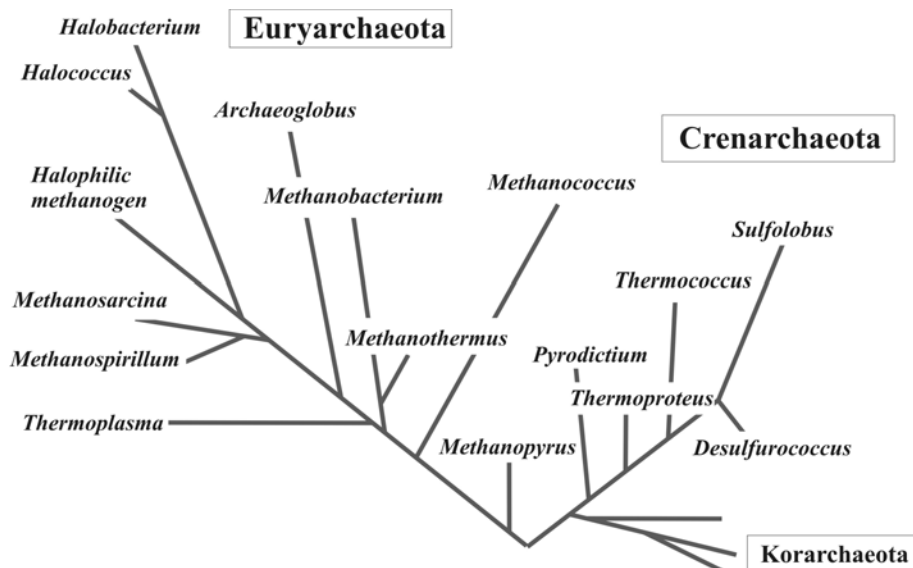


Abbildung 2.9 Phylogenetischer Stammbaum der Archaea (modifiziert nach MADIGAN *et al.*, 1997).

Es wird vermutet, dass extrem thermophile Archaeen phyletisch frühe Organismen sind, da dieser Phänotypus sowohl in allen Reichen der Archaea als auch in phylogenetisch tief stehenden Bakterien, wie den Aquificae und den Thermotogae, zu finden ist (WOESE, 1987; WOESE *et al.*, 1990). Zur Zeit sind mindestens zehn Klassen mit vierzehn Ordnungen der Archaea bekannt (GARRITY *et al.*, 2001). In der Datenbank des NCBI liegen bis jetzt mehr als 2.200 taxonomische Beschreibungen für Archaeen vor.

Der Gestalt nach sind die Archaeenzellen oftmals gestreckte Stäbchen, wenngleich auch weitere von Bakterien bekannte Formen beobachtet wurden. Üblicherweise sind die Zellen der Archaeen etwas geringer als die der Bacteria dimensioniert; so wurden beispielsweise für die aus axinelliden

Poriferen beschriebenen Archaeen maximale Ausmaße von etwa 1,5 µm Länge und 0,5 µm Breite festgestellt (PRESTON *et al.*, 1996; MARGOT *et al.*, 2002). Wie erwähnt unterscheidet sich die Zellwandstruktur der Archaea grundlegend von der der Bacteria. Statt des bakteriogenen Peptidoglykans nutzen verschiedene Archaeen unterschiedliche Polymere zur Bildung der gestaltbestimmenden Schicht der Zellwand (KANDLER und KÖNIG, 1998). Neben dem Pseudopeptidoglykan (*syn.* Pseudomurein) werden verschiedene Schichten aus Polysacchariden, Glycoproteinen oder Proteinen gebildet. Am weitesten verbreitet ist eine typische, aus Proteinen und Glycoproteinen bestehende, parakristalline Oberflächenschicht, die ‚surface layer‘ oder ‚S-layer‘ (MADIGAN *et al.*, 1997). Die Zellwände der meisten Archaeen zeigen ein negatives Gram-Färbeverhalten (KANDLER und KÖNIG, 1998).

### 2.3.2 Auftreten im marinen Milieu

Mit dem Einsatz neuer molekularbiologischer und biochemischer Nachweismethoden wurde in den letzten Jahren erkannt, dass rezent sowohl Angehörige der Cren- als auch der Euryarchaeota eine höhere phylogenetische Diversität aufweisen und ökologisch weiter verbreitet sind, als bislang vermutet wurde. So wurden Vertreter beider Gruppen beispielsweise vielfach in moderat bis gering temperierten oxischen bis anoxischen marinen Gewässern als relevante Bestandteile des Planktons im Epi- und Mesopelagial nachgewiesen (DELONG, 1992; FUHRMAN *et al.*, 1992; 1993; DELONG *et al.*, 1994; FUHRMAN und DAVIS, 1997; DELONG *et al.*, 1998; KING *et al.*, 1998; KARNER *et al.*, 2001). Detaillierte Untersuchungen der vertikalen Verteilung und Zusammensetzung prokaryotischer rRNA an zwei Stationen im Nordpazifik bis in 5000 m Tiefe zeigten, dass der Anteil pelagischer Archaeen am Plankton stark variiert (MASSANA *et al.*, 1997; KARNER *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden signifikant unterschiedliche Beiträge von Euryarchaeota und Crenarchaeota in verschiedenen Wassertiefen beobachtet, wobei Letztere im Allgemeinen gering photische bis aphotische Zonen zu bevorzugen scheinen (MASSANA *et al.*, 1997; DELONG *et al.*, 1999; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002a). Schätzungen von KARNER *et al.* (2001) zufolge befinden sich mit  $1.3 \times 10^{28}$  Archaeenzellen den Bakterien ähnliche Zellbeiträge im globalen Ozean. Der Beginn der Besiedlung von marinen Habitaten durch Archaea ist noch ungeklärt. Fossil sind pelagische Crenarchaeota mit charakteristischen Lipid-Biomarkern von mittelkretazischen Tonschiefern beschrieben (KUYPERS *et al.*, 2001). Das Auftreten dieser Membranbestandteile in oberjurassischen Schiefern der russischen Plattform (*P. Schaeffer*, pers. Mitteilung) zeigt, dass die grundlegende Verbreitung mesophiler Crenarchaeota bereits in präkretazischen Zeiten stattgefunden haben muss. Heute stellen pelagische Archaea etwa 20 % des marinen Picoplanktons (KARNER *et al.*, 2001). Da sie sich bis jetzt einer Kultivierung entziehen, sind ihre phänotypischen Eigenschaften noch ungeklärt.

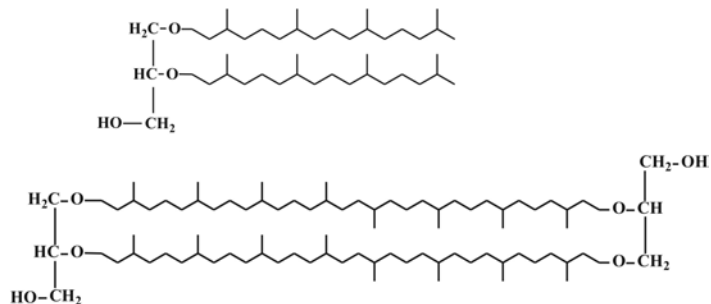
Phylogenetisch diverse Gruppen mesophiler Archaeen sind als epi- und endobenthische Bewohner oxischer bis anoxischer mariner Sedimente bekannt (HOEFS *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998; SAHM und BERNINGER, 1998; SCHOUTEN *et al.*, 1998; VETRIANI *et al.*, 1998; VETRIANI *et al.*, 1999; RAVENSCHLAG *et al.*, 2001). Anhand der Analyse von Gensequenzhomologien wurde gezeigt, dass marine Archaeen bezüglich ihrer phylogenetischen Merkmale auf Angehörige weniger, häufig noch unbeschriebener Taxa konzentriert sind (DELONG, 1992; DELONG *et al.*, 1999).



### 2.3.3 Membranlipide

Ein wichtiges phänotypisches Merkmal aller Archaeen ist die Biosynthese von Glyceroletherlipiden in der Zytoplasmamembran (TORNABENE und LANGWORTHY, 1978; LANGWORTHY, 1985). In diesen sind Isoprenoidkohlenwasserstoffe (Isopranylreste) mit üblicherweise 15 bis 40 C-Atomen über Etherbindungen an das Glycerolskelett gekoppelt. Anders als bei den Lipiden der Bakterien und Eukaryoten werden die Alkylreste in *sn*-2,3-Konfiguration an das Glycerol gebunden. Mit den 2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerolen und den 2,3,2',3'-tetra-*O*-dibiphytanyl-di-*sn*-glycerolen werden zwei Strukturen bevorzugt synthetisiert (Abb. 2.10).

**Abbildung 2.10** Strukturen von Di- und Tetraetherlipiden am Beispiel des Archaeols (2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerol) und des Caldarchaeols (2,3,2',3'-tetra-*O*-dibiphytanyl-di-*sn*-glycerol).



Die Isoprenoidlipide sind Teilstrukturen komplexer Lipide wie Phospho-, Phosphoglyco- oder Glycolipiden, bei denen die Bindung mit vielfältigen polaren Kopfgruppen an der *sn*-1-Position der Glycerolmoleküle vorliegt (LANGWORTHY, 1982; 1985; NISHIHARA *et al.*, 1989; DE ROSA *et al.*, 1991; NISHIHARA *et al.*, 1992; KOGA *et al.*, 1993a; KATES, 1996; SPROTT *et al.*, 1997; SHIMADA *et al.*, 2002). Im Verhältnis zu *a*- bis semipolaren Komponenten treten polare Lipidbestandteile anteilig in den Zytoplasmamembranen deutlich hervor (TORNABENE *et al.*, 1978; THAUER und FUCHS, 1979; JONES *et al.*, 1987).

Etherlipide sind im Vergleich zu den Esterlipiden der Bacteria und Eukarya gegen äußere Einflüsse wie extrem hohe Temperaturen oder Salzgehalte, oder mechanischen Stress außergewöhnlich resistent (VAN DE VOSSENBERG *et al.*, 1998). Auch ist die Protonenpermeabilität von Etherlipiden deutlich in Relation zu Esterlipiden herabgesetzt (YAMAUCHI *et al.*, 1993). Aus diesem Grund besitzen Etherlipide bzw. ihre isoprenoiden Teilstrukturen ein hohes fossiles Erhaltungspotenzial und wurden beispielsweise noch in mesozoischen und känozoischen Sedimenten nachgewiesen (MICHAELIS und ALBRECHT, 1979; MOLDOWAN und SEIFERT, 1979; CHAPPE *et al.*, 1982; MICHAELIS *et al.*, 1988; RICHNOW *et al.*, 1992; KUYPERS *et al.*, 2001). Tetraetherlipide, die membranspannend in vielen thermophilen und extrem acidophilen Archaea, aber auch in nahen mesophilen Verwandten gefunden werden, üben ebenfalls eine die Membran stabilisierende Funktion aus (ELFERINK *et al.*, 1994). Des Weiteren ist von vielen Archaeen eine interne Cyclisierung der Tetraetheralkylreste mit bis zu acht Cyclopentylringen bekannt (DE ROSA *et al.*, 1991; s. Kapitel 6.2.2). Die damit einhergehende Verkürzung der Alkylreste führt, wie molekulare Modelleexperimente von GABRIEL und CHONG (2000) zeigten, zu einer erhöhten Festigkeit der Membran.

## 2.4 Die Porifera

### 2.4.1 Physiologische Merkmale

Das Phylum Porifera (Schwämme) umfasst aquatische, sessile Eukaryoten, die vorwiegend marine Habitate besiedeln. Sie sind überwiegend von Hartböden nahezu aller oxischen Tiefenbereiche bekannt, wo sie sowohl hinsichtlich der Artenzahl als auch der Biomasse eine herausragende Organismengruppe stellen (SARÀ und VACELET, 1973). Zur Zeit werden die drei Klassen der Hexactinellida („Glasschwämme“), der Demospongiae („Hornschwämme“) und der Calcarea („Kalkschwämme“) mit etwa 7000 Spezies differenziert (HOOPER, 2000). Demospongiae sind mit etwa 95 % aller beschriebenen Arten die repräsentativ größte Klasse. Vermutlich in der Kreide sind die Stromatoporida – eine heute zu den Schwämmen gestellte Ordnung noch ungeklärter phylogenetischer Position – ausgestorben. Lediglich aus dem Kambrium ist ferner die Klasse der Archaeocyatha bekannt.

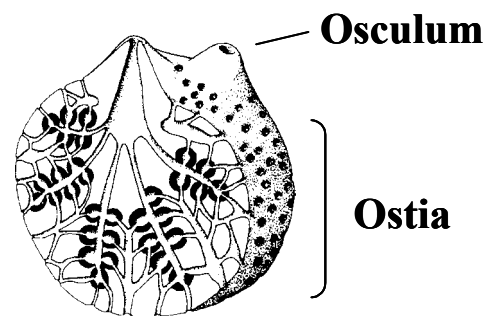
Schwämme ernähren sich von Pico- und Nanoplankton, das sie über eine Vielzahl von Einlassporen, den Ostia, mit dem Umgebungswasser aufnehmen (Abb. 2.11). Die dafür benötigte Wasserströmung wird mit Hilfe interner Kragengeißelzellen (Choanocyten) erzeugt.

Nach Passage eines weit verzweigten Kanalsystems in der gelatinösen Grundmatrix, dem Mesohyl, wird das filtrierte Wasser über eine oder mehrere Ausströmöffnungen (Osculum, Osculi) wieder abgegeben. Porifera besitzen weder ein echtes strukturiertes Gewebe (z.B. Muskelgewebe, Nervensystem) noch Organe, dafür aber differenzierte Zelltypen.

Das Mesohyl wird von einem extrazellulären, fibrösen Protein, dem Kollagen, gebildet und bei den meisten Porifera von einem aus Fasern oder Nadeln, den sog. Skleren (Spiculae), aufgebauten Stützskelett getragen. Aufgrund ihrer Größenverhältnisse wird nach Makrosklern und Mikrosklern unterschieden. Während die Skleren bei den Calcarea aus Calciumcarbonat und bei den Hexactinellida aus Kieselsäure („Skelettopal“) bestehen, synthetisieren Demospongiae kieselige Skleren oder welche aus Spongin, einer strukturellen Modifikation des Kollagens. Skleren besitzen ein relativ hohes fossiles Erhaltungspotenzial und sind von paläontologischer Bedeutung.

Die Morphologie der Porifera ist häufig vom Biotop abhängig und daher sehr variabel. Während verschiedene Taxa lediglich inkrustierend auf Hartsubstrat wachsen, vermögen andere Spezies große Mengen an Biomasse aufzubauen und voluminöse, überwiegend irregulär geformte Körper, deren Ausmaße mehrere Dezimeter betragen können, zu bilden (TABACHNIK, 1991; HOOPER, 2000).

Den meisten Schwämmen ist ein genereller Aufbau gemein, bei dem verschiedene Zellgrundtypen in das Gewebe eingelagert sind. Die Angehörigen der Hexactinellida, die sich durch eine „syncitiale“ Weichkörperorganisation, bei der diskrete Zellen durch ein multinukleates Zytoplasma ersetzt sind, auszeichnen, weichen von dieser Struktur ab (REISWIG, 1979; MACKIE und SINGLA, 1983). Im

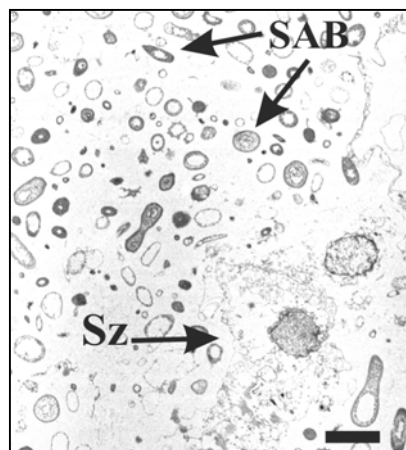


**Abbildung 2.11** Schematischer Querschnitt durch einen Schwammkörper. Schwarz gezeichnete Bereiche geben die Lage der Choanocyten wieder (LEHMANN und HILLMER, 1997).

Gegensatz dazu können die Zellen der Demospongiae und der Calcarea nach ihrem Auftreten in den Körperwandungen, dem Epithelium, oder dem Mesohyl und nach ihrer Funktion unterschieden werden. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Archaeocyten, die sich funktional in alle anderen Zelltypen umwandeln können. Sie sind amöboid in der Matrix beweglich, führen die Aufnahme (Phagocytose) und Verarbeitung der Nahrung durch und geben Nährstoffe an andere Zellen weiter.

Wie erwähnt leben viele Schwämme in Assoziation mit hoch diversen Mikroorganismen-Populationen. Hinsichtlich ihrer Ausmaße sind die Porifera-Zellen zwar sehr verschieden, aber meist deutlich größer als die der Prokaryota. Übliche Dimensionen, die bei Choanocyten, Archaeocyten, Spongocyten und unbestimmte Zellen beobachtet wurden, betragen zwischen 2 und 15  $\mu\text{m}$  (WILLENZ und HARTMANN, 1989; GARSON *et al.*, 1998; FRIEDRICH *et al.*, 1999; MANZ *et al.*, 2000; TURON *et al.*, 2000; RICHELLE-MAURER *et al.*, 2001). Abb. 2.12 zeigt eine Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahme eines Gewebestückes des Kaltwasser-Demospongiae *Geodia barretti*.

**Abbildung 2.12** TEM-Mikrograph des Gewebes von *G. barretti* mit Bakterienzellen unterschiedlicher Morphotypen. SAB = Schwammassoziierte Bakterien, Sz = Schwammzelle, Maßstab 2,5  $\mu\text{m}$ . Leicht verändert nach HOFFMANN (2003).



Porifera reproduzieren sich sowohl asexuell, wobei Zellverbände vom Körper abgeschnürt werden, als auch sexuell. Bei der sexuellen Vermehrung werden Spermien, die sich aus Choanocyten bilden, an das Wasser abgegeben. Die Oocyten entwickeln sich aus Archaeocyten und werden von den Spermien, die über Choanocyten eingestrudelt werden, befruchtet. Der Keim wird dann als Larve abgegeben.

### 2.4.2 Erdgeschichtliches Auftreten und phylogenetische Klassifizierung

Porifera sind erdgeschichtlich sehr früh auftretende und bezüglich ihres Aufbaus die am einfachsten strukturierten Metazoa (KOBAYASHI und SATOH, 1998; MÜLLER und MÜLLER, 1999). In Form kieseliger Skleren reichen die fossilen Nachweise der Porifera bis in das späte Proterozoikum zurück (GEHLING und RIGBY, 1996; BRASIER *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1998; DEBRENNE, 1999). Die zur Zeit ältesten Funde von Demospongiae-ähnlichen Skleren wurden vor kurzem von REITNER und WÖRHEIDE (2002) von einem 750 Mio. Jahre alten Dolomitgestein Nevadas berichtet. Da Skleren aber keine obligaten Merkmale der Poriferen sind, datiert ihre Entstehung möglicherweise früher. So kalkulierte MÜLLER (1997) auf Grundlage der Zusammensetzung von Aminosäure-Sequenzen die Entstehung des Phylums auf eine Zeit vor 800 Mio. Jahren. Die Präsenz spezifischer Sterane in 1,8 Mrd. Jahre alten Sedimenten deuten MCCAFFREY *et al.* (1994) als Hinweis auf noch erheblich frühere Ursprünge dieser Gruppe. In jedem Fall aber scheinen sich die Porifera seit ihrer Etablierung ökologisch kaum weiterentwickelt zu haben, und dennoch stellen sie wichtige Faunenelemente im gesamten Phanerozoikum. So waren verschiedene Taxa der Hexactinellida und Demospongiae wiederholt in allen Systemen des Paläozoikums und insbesondere auch in der Oberjura des Tethys-Nordrandes hervortretende Riffbildner (BRACHERT, 1991; BRUNTON und DIXON, 1994; RIDING und ZHURAVLEV, 1995).

Rezent besiedeln die Klassen mariner Porifera verschiedene Lebensräume. Während sich *Calcarea* vorwiegend in küstennahen Gebieten bis etwa 10 m Tiefe ansiedeln, sind *Demospongiae* bis etwa 300 m Wassertiefe verbreitet, treten aber auch in limnischen Systemen auf. *Hexactinellida* Schwämme bevorzugen dagegen Tiefwassergebiete mit geringer makrobenthischer Besiedlung (TABACHNIK, 1991) und wurden noch in Tiefen von > 6000 m gesichtet.

Phyletische und taxonomische Klassifizierungen von Porifera werden traditionell anhand typischer Körpermerkmale wie der Sklerengeometrie (REITNER und MEHL, 1996; HOOPER, 2000) und in den vergangenen Jahren zunehmend auch mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren durchgeführt (ADAMS *et al.*, 1999; ERPENBECK *et al.*, 2002). Die generelle Monophylie von Porifera gilt als sehr wahrscheinlich (CAVALIER-SMITH *et al.*, 1996; VAN DE PEER und DE WACHTER, 1997; BORCHIELLINI *et al.*, 1998; KRUSE *et al.*, 1998), jedoch sind die phylogenetischen Beziehungen der Klassen noch nicht abschließend geklärt und verschiedene Gruppierungen werden diskutiert. Eine kürzlich durchgeführte, umfassende biochemische Studie an nahezu 40 Porifera der drei rezenten Klassen legt aufgrund des Auftretens charakteristischer Membranlipide die Vermutung nahe, dass die *Hexactinellida* und die *Demospongiae* einer gleichen phyletischen Gruppe zugehörig sind (THIEL *et al.*, 2002, im Anh.).

### 2.4.3 Membranlipide

Porifera besitzen einen sehr umfangreichen Lipidgehalt, der strukturell variable Substanzklassen umfasst und dessen Komponenten vielfach in anderen Organismen nicht gefunden werden. Bekannt ist, dass viele Spezies mit internen hoch diversen Mikroorganismengemeinschaften assoziiert sind, die zum Gesamtlipidinventar beitragen (s. Kapitel 2.5).

Als Angehörige der Eukarya synthetisieren Porifera typischerweise Lipide mit Steroid- und konventionellem *sn*-1,2-Diacylglyceroldiester-Grundgerüst. Vielfach findet sich daneben eine außergewöhnliche Bandbreite von Steroidalkoholen mit divers strukturierten Ringgerüsten oder ungewöhnlich modifizierten Seitenketten (DJERASSI und SILVA, 1991; KERR und BAKER, 1991; GINER, 1993; AIELLO *et al.*, 1999; BLUMENBERG *et al.*, 2002, im Anh.). Für viele Porifera typische Lipide sind des Weiteren die ‚demospongiac acids‘ – langkettige, lineare und methylverzweigte  $\Delta^{5,9}$ -Carbondien- und  $\Delta^{5,9,x}$ -Carbontriensäuren,  $\geq C_{24}$  –, die bis vor kurzem vornehmlich aus Phospholipidfraktionen vieler *Demospongiae* bekannt waren (z.B. JEFFERTS *et al.*, 1974; LITCHFIELD *et al.*, 1976; LITCHFIELD und MORALES, 1976; BERGQUIST *et al.*, 1984; LAWSON *et al.*, 1984; CARBALLEIRA und REYES, 1990; BARNATHAN *et al.*, 1994). In einer neueren Studien wurden weiterhin  $C_{28}$ - bis  $C_{32}$ -Strukturäquivalenten von allen untersuchten *Hexactinellida* dokumentiert (THIEL *et al.*, 2002). Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass ‚demospongiac acids‘ via  $C_2$ -Elongation kurzkettiger Carbonsäuren potenziell bakterieller Herkunft und nachfolgender Untersättigung gebildet werden (MORALES und LITCHFIELD, 1976; CARBALLEIRA *et al.*, 1986; RAEDERSTORFF *et al.*, 1987; HAHN *et al.*, 1988).

Eine detaillierte Charakterisierung eukaryotischer Lipide der in dieser Arbeit auf prokaryotische Biomarker untersuchten Porifera wurde von BLUMENBERG (2003) im Rahmen einer Dissertation durchgeführt.

## 2.5 Gemeinschaften von Poriferen und Mikroorganismen

Verschiedenartige komplexe Assoziationen von Bakterien mit Poriferen sind bekannt (s. auch Abb. 2.12). Und auch in anderen marinen Invertebraten wie Cnidarien, Bryozoen, Mollusken, Pogonophoren, Echinodermaten, Tunikaten und Crustaceen treten bakterielle Endobionten auf (s. auch Review HAYGOOD *et al.*, 1999). Mit Poriferen assoziierte Mikroorganismen wurden seit den frühen Arbeiten von DOSSE (1939) besonders in den 1960er und 70er Jahren intensiv u.a. von LÉVI (1976), Vacelet (1970; 1975), Sarà (1973), Reiswig (1974; 1981), Wilkinson (1978a; b; c) und ihren Mitarbeitern erforscht. Neben häufig vorkommenden Bakterienstämmen wurden weitere mit Poriferen vergesellschaftete prokaryotische und auch eukaryotische Kleinstlebewesen beobachtet. In Flachwasserhabitaten sind Assoziationen mit unizellulären oder filamentösen Cyanobakterien häufig (VACELET, 1971; WILKINSON, 1983; RÜTZLER, 1985; UNSON und FAULKNER, 1993; WILKINSON *et al.*, 1999; THACKER und STARNES, 2003). Gelegentlich wurden Diatomeen (Bacillariophyceae, Kieselalgen), Zooxanthellae (Dinophyceae, Rotalgen) oder Zoochlorellae (Chlorophyta, Grünalgen) als Mikrobiota in Poriferen beschrieben (SARÀ und LIACI, 1964; GARSON *et al.*, 1998; CERRANO *et al.*, 2000). Fungi oder Nematocysten scheinen dagegen nur selten in Poriferen aufzutreten (GARSON *et al.*, 1998; LOPEZ *et al.*, 1999).

Archaeen sind in Poriferen sehr selten gefunden worden und schienen bis vor kurzem auf ceractinomorphe Demospongiae beschränkt gewesen zu sein (PRESTON *et al.*, 1996; FUERST *et al.*, 1999; WEBSTER *et al.*, 2001a; MARGOT *et al.*, 2002). Global betrachtet scheinen aber Assoziationen zwischen Poriferen und chemotrophen Bakterien qualitativ und quantitativ am weitesten verbreitet zu sein. Da die Dominanz bakterieller Endobionten auch für den überwiegenden Teil der bearbeiteten Poriferen, d.h. für die Hexactinellida und Demospongiae, beobachtet wurde, werden im Folgenden die Kenntnisse über diese Gemeinschaften diskutiert. Ferner wird zusammenfassend auf das Vorkommen von Archaeen in Poriferen eingegangen.

### 2.5.1 Assoziationen mit Bacteria

In zahlreichen Artikeln wurden morphologisch, physiologisch und phylogenetisch sehr heterogen zusammengesetzte und spezifische Bakterien-Konsortien im Gewebe von Poriferen – vornehmlich aus Ordnungen der Demospongiae und Calcarea – beschrieben (WILKINSON, 1978a; b; c; WILLENZ und HARTMANN, 1989; SANTAVY und COLWELL, 1990; BURJA *et al.*, 1999; FRIEDRICH *et al.*, 1999; FUERST *et al.*, 1999; LOPEZ *et al.*, 1999; WEBSTER *et al.*, 2001b; HENTSCHEL *et al.*, 2002). In anderen Taxa dieser Schwammklassen sowie in hexactinelliden Poriferen wurden dagegen oftmals vergleichsweise moderate oder geringe Gehalte an bakteriellen Bestandteilen beobachtet (VACELET und DONADEY, 1977; WILKINSON, 1978b; MACKIE und SINGLA, 1983; WILKINSON, 1984; THIEL *et al.*, 2002), so dass REISWIG (1981) die Begriffe ‚*Bacteriosponge*‘ bzw. ‚*non-Bacteriosponge*‘ zur generellen Beschreibung der Bakteriendichte in Poriferen einführte. Eine besonders hohe Populationsdichte von Bakterien liegt vor allem bei massigen Poriferen mit vergleichsweise großem Mesohyl-Anteil vor (VACELET und DONADEY, 1977; WILKINSON, 1978a), die demzufolge als *Bacteriosponge* zu kennzeichnen sind. Wie histologische Untersuchungen nachwiesen, treten schwammassoziierte Bacteria (SAB) permanent sowohl extra(,inter‘)- als auch intrazellulär unterschiedlich konzentriert in den jeweiligen Kompartimenten des Mesohyls auf (VACELET und DONADEY, 1977; WILKINSON, 1978b; VACELET *et al.*, 1996; FRIEDRICH *et al.*, 1999; WEBSTER *et al.*, 1999).

## 2 Bacteria, Archaea und Porifera

---

*al.*, 2001b). Auf Grundlage derartiger Beobachtungen ordnete VACELET (1970) SAB den folgenden hypothetischen Kategorien zu:

- Geringe Populationen kosmopolitischer Bakterien, die in ihrer Zusammensetzung denen des Umgebungswassers ähneln und vermutlich als Nahrung dienen.
- Große Populationen artspezifischer im Mesohyl (extrazellulär) auftretender Bakterien; diese sind nicht im Umgebungswasser zu finden und umfassen sehr wahrscheinlich echte Symbionten.
- Kleine Populationen permanent intrazellulär oder sogar intranuklear existierender Bakterien; diese sind sehr wahrscheinlich ebenfalls echte Symbionten.

Zellen assoziierter Bakterien können einen hohen Anteil (bis 40 % des Mesohylvolumens von *Jaspis stellifera*) an der Biomasse des Gesamtorganismus einnehmen (VACELET, 1975; WILKINSON, 1978c; WILLENZ und HARTMANN, 1989). Aufgrund ihrer enormen Bakteriendichte im Mesohyl können *Bacteriosponges* auch als bakterielle Agglomerate bezeichnet werden. Tatsächlich wurden in einigen *Bacteriosponges* im Vergleich zu ihrem Umgebungswasser um zwei bis drei Größenordnungen erhöhte bakterielle Zellzahlen vorgefunden (BURJA *et al.*, 1999; FRIEDRICH *et al.*, 2001).

Im Allgemeinen sind viele der SAB oder ihnen phylogenetisch nahe stehende Bakterien weder aus dem Umgebungswasser der Poriferen noch aus anderen marinen Animalia bekannt (SANTAVY und COLWELL, 1990; SANTAVY *et al.*, 1990; BURJA *et al.*, 1999; HENTSCHEL *et al.*, 2002). Vielfach wurden über lange Zeiträume stabile Endobionten-Populationen (WEBSTER und HILL, 2001; MARGOT *et al.*, 2002) sowie ähnliche Zusammensetzungen in mehreren Individuen gleicher oder verschiedener Spezies (PRESTON *et al.*, 1996; VACELET *et al.*, 1996; ALTHOFF *et al.*, 1998; BURJA *et al.*, 1999; HENTSCHEL *et al.*, 2002) beobachtet. Von großem Interesse ist auch die Präsenz ähnlicher Bakteriengemeinschaften oder Teilen davon in Arten geographisch distanzierter Gebiete (ALTHOFF *et al.*, 1998; WEBSTER und HILL, 2001; HENTSCHEL *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde mehrfach geschlossen, dass SAB mit dem Wirtsorganismus in spezifischen Symbiosen leben.

Die allgemeine Ökologie des Phylums Porifera hat sich vermutlich seit seiner Entstehungen im Präkambrium nur geringfügig verändert. Poriferen-Mikroben-Gemeinschaften sind fossil z.B. als Riffbildner seit dem frühen Kambrium im gesamten Phanerozoikum nachgewiesen (BRUNTON und DIXON, 1994; RIDING und ZHURAVLEV, 1995). Es ist daher anzunehmen, dass assoziierte bzw. symbiontische Mikroorganismen eine wesentliche Funktion bei der Entwicklung der Metazoa ausübten (WILKINSON, 1984; THIEL, 1997; ERPENBECK *et al.*, 2002). Auf der Grundlage ihrer Physiologie und bekannter Stoffwechsellätigkeiten werden u.a. folgende für die Ökologie des Wirtsorganismus vorteilhafte Interaktionen mit assoziierten Mikroorganismen vermutet:

- **Gewährleistung eines kontinuierlichen Angebots an Nährstoffen und an Vorläuferkomponenten für die Lipidsynthese**

Die Phagozytose von Bakterienzellen ist in mehreren mikroskopischen Arbeiten anhand verschiedener Poriferen beschrieben worden (REISWIG, 1975; VACELET und DONADEY, 1977; WILKINSON, 1978b). Die Poriferenzellen scheinen dabei zur Differenzierung zwischen SAB und infiltrierten Bakterien befähigt zu sein (WILKINSON *et al.*, 1984; WEBSTER und HILL, 2001).

Basierend auf der Kenntnis assoziierter Bakterienpopulationen, ihrer Verbreitung im Gewebe der Poriferen sowie ihrer metabolischen Fertigkeiten vermuten viele Bearbeiter daher, dass essentielle Nährstoffe und Substrate, für deren direkte Nutzung Poriferen nicht befähigt sind, mit Hilfe von Bakterien inkorporiert werden (REISWIG, 1975; VACELET, 1975; WILKINSON und FAY, 1979; REISWIG, 1981; WILKINSON, 1983; RÜTZLER, 1985; SHIEH und LIN, 1994; VACELET *et al.*, 1995; VACELET *et al.*, 1996; SCHUMANN-KINDEL *et al.*, 1997; WILKINSON *et al.*, 1999).

Von besonderen Interesse für diese Arbeit ist die Nutzung kurzkettiger Carbonsäuren für die Synthese der ‚demospongiac acids‘, wie sie mit Hilfe von Fütterungsversuchen radioisotopisch markierter Substanzen nachgewiesen wurde (CARBALLEIRA *et al.*, 1986; RAEDERSTORFF *et al.*, 1987). Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass assoziierte Bakterien eine bedeutende Rolle im Anabolismus jeweiliger Poriferen spielen (s. Kapitel 5.5.2).

- **Verarbeitung und Translokation von Stoffwechselprodukten**

REISWIG (1971) beobachtete periodische Unterbrechungen der Pumpaktivität in einigen tropischen Poriferen. Der Nachweis fakultativ respiratorischer Bakterien in Poriferen führte WILKINSON (1978b) zu der Annahme, dass diese beispielsweise potenziell zelltoxische Stoffwechselprodukte in Phasen unterbrochener Exkrementabgabe durch metabolische Umsetzung entfernen.

- **Stabilisierung des Schwammskelettes**

In einigen Spezies wurden mit den Skleren assoziierte kalzifizierende Algen gefunden (RÜTZLER, 1985). In anderen Poriferen wurden ebenfalls erhöhte Gehalte dieser Algen beobachtet, so dass für sie eine skelettstabilisierende Funktion angenommen wird (WILKINSON *et al.*, 1981). Für die Präsenz relativ großer Kolonien schleimbildender Bakterien in skelettarmen Arten vermutet WILKINSON (1978b) ebenfalls strukturverstärkende Funktionen.

- **Unterstützung des Abwehrsystems des Wirtsorganismus**

Viele Poriferen sind potente Produzenten biologisch aktiver Metaboliten und in einigen Fällen wurde nachgewiesen, dass diese Komponenten bakterieller Herkunft sind (s. Kapitel 2.5.3). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Metaboliten assoziierter Mikroorganismen zur Verstärkung des Abwehrsystems gegen Fraßfeinde oder Raumkonkurrenten eingesetzt werden (MCCLINTOCK und BAKER, 1997; PROKSCH *et al.*, 2002).

Die jeweiligen Interaktionen zwischen den Poriferen und symbiontischen Mikroorganismen sind nur ansatzweise verstanden. Allgemein scheinen die Wirtsorganismen jedoch die Voraussetzungen für ein so genanntes ‚bacterial farming‘ zu schaffen und so die Reproduktion assoziierter Mikrobiota zu beeinflussen (WILKINSON, 1978c; SANTAVY und COLWELL, 1990). Da die metabolischen Fähigkeiten der Mikroorganismen nicht Hauptgegenstand dieser Arbeit sind, werden im Folgenden die Beziehungen zwischen Poriferen und endobiontischen Mikroorganismen als Assoziationen bezeichnet.

Wenig verstanden ist in diesem Zusammenhang bislang auch die Herkunft assoziierter Mikrobiota. Eine Weitergabe der mikrobiellen Assoziante während der asexuellen Vermehrung der Poriferen ist als einfachster Mechanismus plausibel. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten des Weiteren, dass Endobionten bei der oviparen Fortpflanzung mit der Larve an die nächste Generation übertragen werden (GALLISIAN und VACELET, 1976; LÉVI und LÉVI, 1976; VACELET *et al.*, 1996). Beide Methoden deuten auf evolutiv lang anhaltende Beziehungen zwischen SAM und ihren Wirtsorganismen hin.

## 2 Bacteria, Archaea und Porifera

Die Ergebnisse vergleichender 16S-rRNA-Analysen an zwei Arten unterschiedlicher Demospongiae-Ordnungen verschiedener geographischer Regionen führten die Autoren einer kürzlich erschienenen Arbeit zu einem anderen Erklärungsansatz. Die Bearbeiter beobachteten in *Aplysina aerophoba* und *Theonella swinhoei* sich in ihrer Zusammensetzung stark ähnelnde bakterielle Konsortien. Als Ursache für diesen Befund halten HENTSCHEL *et al.* (2002) die effektive Akkumulation bestimmter, im Umgebungswasser infolge ihrer geringen Konzentrationen noch nicht nachgewiesener Bakterien für sehr wahrscheinlich.

Um einen Überblick der häufig mit Poriferen assoziierten Bakterien zu geben, sind in Tabelle 2.1 die mit unterschiedlichen mikrobiologischen Nachweismethoden (Kultivierung, Elektronenmikroskopie, FISH und 16S-rRNA-Gensequenzanalyse) in Demospongiae verschiedener Habitate beobachteten bakteriellen Großgruppen aufgeführt. In der Auflistung wurden Studien berücksichtigt, die zu eindeutigen phylogenetischen Einordnungen der Bakterien führten und die für das untersuchte Probenmaterial relevant sind. Eine detaillierte Übersicht der Gattungen von SAB, der Methoden, die zu ihrem Nachweis führten sowie der Autoren ist im Anhang dieser Arbeit gegeben.

<b>Phylum</b>	<b>Klasse</b>	<b>Ordnung</b>
<b>Chloroflexi</b>	<b>Chloroflexi</b>	Chloroflexales
<b>Nitrospira</b>	<b>Nitrospira</b>	n.b.
<b>Chlorobi</b>	<b>Chlorobia</b>	Chlorobiales
<b>Proteobacteria</b>	<b><math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>	Rhodospirillales
		Rhodobacterales Sphingomonadales Rhizobiales n.b.
	<b><math>\beta</math>-Proteobacteria</b>	Burkholderiales n.b.
	<b><math>\gamma</math>-Proteobacteria</b>	Chromatiales Thiothrichales Pseudomonadales Alteromonadales Vibrionales Aeromonadales Enterobacterales n.b.
<b>Firmicutes</b>	<b>Clostridia</b> <b>Bacilli</b>	n.b. Bacillales Lactobacillales
		<b>Actinobacteria</b>
<b>Planctomycetes</b>	<b>Planctomycetacia</b>	Planctomycetales
<b>Spirochaetes</b>	<b>Spirochaetes</b>	Spirochaetales
<b>Acidobacteria</b>	<b>Acidobacteria</b>	Acidobacterales
<b>Cytophaga- Flavobacterium- Bacteroidetes- Gruppe</b>	<b>Bacteroidetes</b>	Bacteroidales
	<b>Flavobacteria</b>	Flavobacterales
	<b>Sphingobacteria</b>	Sphingobacterales
	n.b.	n.b.

(n.b. = taxonomische Einheit nicht bestimmt)

**Tabelle 2.1** Großgruppen der für Demospongiae beschriebenen Bakterien (die taxonomische Klassifizierung erfolgte in Anlehnung an *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, 2001*). Schwammassoziierte Cyanobakterien wurden nicht aufgeführt.



Wie Tabelle 2.1 zeigt, sind mit Demospongiae vergesellschaftete Bakterien aus mindestens zehn Phyla bekannt. Neben im marinen Bereich häufig auftretenden Angehörigen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien, der Chloroflexi, der Actinobacteria, die Planctomycetes und der Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides-Gruppe sind einige seltenere Phyla in den Poriferen, wie die  $\beta$ -Proteobacteria oder die Clostridia, beobachtet worden.

Zu der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften in Demospongiae gibt erst seit kurzem zuverlässige Daten. In den meisten *Bacteriosponges* liegt eine phylogenetisch divers zusammengesetzte bakterielle Population vor, und nur in wenigen Fällen wurde die Dominanz eines einzigen Bakteriums festgestellt (ALTHOFF *et al.*, 1998). Bei 16S-rRNA-Gensequenzanalysen an DNA-Fragmenten aus *Rhopaloeides odorabile* gruppierten die bakteriellen Klone zu 41 % innerhalb der  $\gamma$ -Proteobacteria und zu 30 % innerhalb der Actinobacteria (WEBSTER *et al.*, 2001b). Dagegen wurden in *Aplysina aerophoba*  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakterien, Bacteroidetes und unbestimmte Gram-positive Organismen als vorherrschende Bakterienklassen festgestellt (FRIEDRICH *et al.*, 2001). HENTSCHEL *et al.* (2002) beobachteten in Vertretern dreier Porifera-Spezies aus vier verschiedenen Gebieten, dass einige Bakterienphyla, wie die  $\gamma$ -Proteobacteria, die Actino- und Acidobacteria sowie die Bacteroidetes-Gruppe, in allen Individuen auftreten, während andere Phyla ( $\delta$ -Proteobacteria, Chloroflexi) lediglich als Endobionten individueller Poriferen vertreten sind.

Der hohen phylogenetischen Diversität entsprechend sind für kultivierte SAB vielfältige physiologische Eigenschaften hinsichtlich der Art der C-Fixierung, der O<sub>2</sub>-Toleranz, der Energieumsetzung etc. festgestellt worden. Die üblichen Angaben für die Ausmaße von SAB-Zellen, wie sie mit elektronenmikroskopischen Methoden bestimmt wurden, decken einen für Bakterien typischen Bereich von etwa 0,3 bis 6,0  $\mu\text{m}$  ab (VACELET und DONADEY, 1977; WILKINSON, 1978c; MANZ *et al.*, 2000).

Neuere vergleichende Studien, bei denen phylogenetische Untersuchungen wie Sequenzanalysen der rRNA einbezogen wurden (WEBSTER *et al.*, 2001b; HENTSCHEL *et al.*, 2002), zeigen, dass die Ergebnisse klassischer physiologischer und zytologischer Ansätze (Isolierung, Mikroskopie) für detaillierte Charakterisierungen des mikrobiellen Inventars in Porifera-Individuen unzureichend sind.

Die bis jetzt veröffentlichten Analysen des Lipidinventars in Poriferen, die sich methodisch auch für derartige Fragestellungen eignen, beschäftigen sich allerdings nur sekundär mit diskreten Bakterientaxa (BARNATHAN *et al.*, 1992; BARNATHAN *et al.*, 1994; GARSON *et al.*, 1994). Eine eingehende Diskussion der Herkunft einzelner bakterieller Membranlipide in Porifera-Extrakten wurde nur von wenigen Autoren, wie z.B. von WALKUP *et al.* (1981), GILLAN *et al.* (1988) und THIEL (1997) bzw. THIEL *et al.* (1999a), durchgeführt.

Zur Zeit gibt es daher noch keine Arbeit, in der Lipidbiomarker zur qualitativen und quantitativen phylogenetischen Charakterisierung der mikrobiellen Population in Poriferen herangezogen wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Biomarkeranalyse zur detaillierten taxonomischen Klassifizierung von SAB, die mit anderen Methoden bislang nicht erfasst wurden, eignet.

### 2.5.2 Assoziationen mit Archaea

Von wenigen Arbeiten sind Assoziationen von Archaeen mit marinen Animalia bekannt. Neben vereinzelten Vorkommen in Tiefseeholothurien (MCINERNEY *et al.*, 1995) und Fischen der Nordsee (VAN DER MAAREL *et al.*, 1998) ist von endobiontischen Archaeen aus Poriferen berichtet worden. Generell ist daher noch sehr wenig über die phylogenetischen und physiologischen Eigenschaften schwammassoziierter Archaeen bekannt.

Basierend auf den Befunden verschiedener methodischer Ansätze sind bis vor kurzem Vertreter der Crenarchaeota und Euryarchaeota lediglich aus tetractino- und ceractinomorphen Demospongiae nachgewiesen worden. In einer molekularbiologischen Studie gelang PRESTON *et al.* (1996) am halichondriden *Axinella mexicana* aus kalifornischen Küstengewässern der Erstnachweis eines psychrophilen Crenarchaeons mit der Bezeichnung *Cenarchaeum symbiosium*, von dem inzwischen mindestens zwei Phylotypen bekannt sind (SCHLEPER *et al.*, 1998). Aufgrund seines stabilen Auftretens in mehr als 20 in einem Zeitraum von acht Monaten beprobten Individuen vermuteten PRESTON *et al.* (1996), dass *C. symbiosium* symbiontisch in *A. mexicana* lebt.

WEBSTER *et al.* (2001a) wiesen mit Hilfe von 16S-rRNA-Analysen eine bis jetzt unbestimmte Spezies der Crenarchaeota, die eine Sequenzähnlichkeit von 92 % zu *C. symbiosum* aufweist, sowie eine Euryarchaeota-Spezies der Ordnung Methanomicrobiales in dem ceractinomorphen *Rhopaloeides odorabile* nach. FISH-Experimente mit einer universellen Oligonukleotidsonde zeigten eine höhere Dichte der Archaeenzellen im Pinacoderm als im Mesohyl dieses Schwamms.

Ebenfalls durch Anwendung mehrerer mikrobiologischer Methoden (TEM, FISH und Gensequenzierungen) wiesen MARGOT *et al.* (2002) bis jetzt unbestimmte filamentöse artspezifische Crenarchaeota in drei mediterranen axinelliden Poriferen (*A. damicornis*, *A. verrucosa* und *Axinella* sp.) nach. Für die untersuchten Crenarchaeota wurden Sequenzhomologien der 16S-rRNA von 91–92 % zu marinen planktonischen Crenarchaeota und von 94 % zu *C. symbiosum* bestimmt. Die Autoren vermuten aufgrund des ausschließlichen Vorkommens der Crenarchaeota in dem die Skleren umgebenden Kollagen symbiotische Beziehungen zum Wirtsorganismus. In einer mikromorphologischen Arbeit wurden von FUERST *et al.* (1999) in drei Poriferen (*Pseudoceratina crassa*, *Jaspis stellifera* und *Axinyssa* sp.) des Great-Barrier-Reefs mindestens zwei verschiedene prokaryotische Morphotypen, deren Zellwandstrukturen und Nukloidaufbau denen bekannter Crenarchaeota sehr ähnlich sind, beobachtet.

Morphologisch sind die beobachteten Einzelzellen von Archaea überwiegend stäbchenförmig. Im Vergleich zu den typischen bakteriellen Zellen in Poriferen sind die der Archaeen deutlich geringer dimensioniert. Während für *C. symbiosum* im Durchschnitt 0,5 µm Breite und 0,8 µm Länge bestimmt wurden (PRESTON *et al.*, 1996), sind die Einzelzellen der von MARGOT *et al.* (2002) beschriebenen filamentösen Archaeen etwa 0,2 bis 0,3 µm breit und 1,0 bis 1,5 µm lang. Ebenso wie der überwiegende Teil der SAB sind auch die Archaeen bis jetzt einer Isolierung in Reinkultur mit herkömmlichen mikrobiologischen Methoden entgangen. Aus diesem Grund sind die phänotypischen und metabolischen Eigenschaften endobiontischer Archaeen unklar.

### 2.5.3 Schwammassoziierte Mikroorganismen als Produzenten von Sekundärmetaboliten

Im Vergleich mit anderen marinen Organismen gilt das Ökosystem Porifera als qualitativ und quantitativ stärkste Quelle von Sekundärmetaboliten (PROKSCH, 1991; GARSON, 1993; PAWLIK, 1993; MCCLINTOCK und BAKER, 1997; HAYGOOD *et al.*, 1999; CAPON, 2001). Es wird vermutet, dass die vergleichsweise lange gemeinsame Evolutionsgeschichte von Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen (SAM) förderlich für die Entwicklung komplexer Strukturen mit bioaktivem Potenzial war. In den meisten Fällen ist der Nachweis der Produzenten von Sekundärmetaboliten – Schwamm oder SAM – noch nicht gelungen. Das Auftreten biologisch aktiver Komponenten in den untersuchten Schwämmen sowie der mit ihnen vergesellschafteten SAM wird im Rahmen des BMBF-Projektes BOSMAN von verschiedenen wissenschaftlichen Gruppen mit Hilfe biologischer Testverfahren überprüft.

Sekundärstoffe wurden bis jetzt überwiegend in Vertretern der Demospongiae gefunden (HIGGS und FAULKNER, 1978; PERRY *et al.*, 1994; SCHMITZ, 1994; HIROTA *et al.*, 1996; BEWLEY und FAULKNER, 1998; COMPAGNONE *et al.*, 1998; MATSUNAGA *et al.*, 1998; CHILL *et al.*, 2000; CLARK *et al.*, 2001; FAULKNER, 2002). Häufig auftretende Bestandteile der Metaboliten sind Furan-, Phenol- und Aminstrukturen, die oftmals über Ether-, Ester- und/oder Peptidbindungen zu komplexen Makromolekülen, wie Terpenoiden, Polyketiden, Polypeptiden, Alkaloiden oder Makroliden, verknüpft sind (FAULKNER, 2000; 2002). Bioaktive Sekundärmetaboliten aus Poriferen, wie Avarol, Discodermolid, Spongistatin, Manoalid, die Manzamine, die Halichondrine oder die Swinholide, zeigen beispielsweise virenhemmende, zytotoxische, antitumorale oder antiinflammatorische Wirkung und werden bereits in der Human-Therapie eingesetzt bzw. befinden sich in späten klinischen Testphasen (SCHMITZ, 1994; FUSEYANI, 1996; URIZ *et al.*, 1996; KOBAYASHI und KITAGAWA, 1998; LINDEL, 1998; MÜLLER *et al.*, 2000; PROKSCH *et al.*, 2002).

Für eine biotechnologische Nutzung von Sekundärstoffen aus Schwamm-Mikroorganismen-Gesellschaften ist die Generierung wirksamer Metaboliten durch Bakterien von Vorteil. Neben den vergleichsweise hohen Reproduktions- und Biomassezuwachsrate, die eine hohe Ausbeute an den Zielkomponenten gewährleisten können, ist die weniger aufwändige Kultivierung im Vergleich mit der Schwammaufzucht zu nennen. Für viele Gruppen von Mikroorganismen terrestrischer und mariner Habitate, von denen Angehörige in Porifera auftreten, sind eine Reihe verschiedener Sekundärstoffklassen mit teilweise hoch komplexen Strukturen bekannt (FENICAL, 1993; GARSON, 1993; KOBAYASHI und ISHIBASHI, 1993; MOORE, 1999). Produzenten chemisch interessanter und partiell biologisch aktiver Metaboliten sind beispielsweise in der Gruppe der Cyanobacteria beobachtet worden. Außergewöhnlich potente Bakterien sind in dieser Hinsicht auch Actinobakterien und im Besonderen die Familie der Streptomycetaceae sowie Vertreter der Proteobacteria (FENICAL, 1993; JENSEN und FENICAL, 1994; IVANOVA *et al.*, 1998b; LOVEJOY *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 1999; HOLMSTRÖM und KJELLEBERG, 1999). Aufgrund von Strukturähnlichkeiten charakteristischer Naturstoffe aus Bakterienisolaten und aus Poriferen wurde vermutet, dass SAB Quellorganismen verschiedener in Schwämmen nachgewiesener Sekundärstoffe sind. Ähnlich strukturiert sind beispielsweise die Makrocyclen Discodermid aus dem Schwamm *Discodermia dissoluta* (GUNASEKERA *et al.*, 1991) und Alteramid aus dem Bakterium *Alteromonas* sp., das wiederum aus *Halichondria okadae* isoliert wurde (SHIGEMORI *et al.*, 1992).

## 2 Bacteria, Archaea und Porifera

---

Die Kenntnis der phylogenetischen Positionen und metabolischen Fertigkeiten von SAM spielt somit eine wesentliche Rolle bei der Suche und Nutzung mikrobieller Naturstoffe aus Porifera. Auch aufgrund einer sehr geringen Ausbeute (max. 11 %, üblicherweise < 1 %) bei Kultivierungsansätzen der mit Demospongiae assoziierten Bakterien mit konventionellen Methoden (SANTAVY *et al.*, 1990; BURJA *et al.*, 1999; WEBSTER und HILL, 2001) konnten jedoch bislang nur in wenigen Fällen Sekundärmetaboliten in Poriferen zweifelsfrei ihren (bakteriellen) Produzenten zugeordnet werden. Aus diesem Grund sind auch die Metabolismen und ökologischen Funktionen vieler schwammassoziierten Bakterien noch nicht geklärt. Ebenso sind auch schwammassoziierte Archaeen bis jetzt einer Kultivierung mit traditionellen Methoden entgangen, so dass ihre Metabolismen unklar sind. Das Sekundärstoffpotenzial mariner Archaeen ist im Allgemeinen noch wenig erforscht, scheint aber im Vergleich zu dem der Bakterien eher gering zu sein (SCHIRALDI *et al.*, 2002).

In den letzten Jahren sind mehrere mit Poriferen vergesellschaftete Bakterienstämme in Kultur zweifelsfrei als Quellen von Sekundärmetaboliten entdeckt worden. Ausgewählte SAB und die in ihnen nachgewiesenen Naturstoffe sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2 Ausgewählte schwammassoziierte Bakterien mit bekannten Sekundärstoffen und ihren Wirkungen.

Stamm	Phylum	Substanzklasse(n)	Trivialname	Porifera	Aktivität	Quelle
<i>Oscillatoria spongeliae</i>	Cyanobacteria	Polychlorierte Diketopiperazine		<i>Dysidea herbacea</i>		UNSON und FAULKNER, 1993; FLOWERS <i>et al.</i> , 1998
<i>Oscillatoria spongeliae</i>	Cyanobacteria	Aminosäurederivate, Polybromierte Diphenylether		<i>Dysidea herbacea</i>		UNSON <i>et al.</i> , 1994
<i>Alteromonas</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	tetracyclisches Lactam	<b>Alteramid A</b>	<i>Halichondria okadai</i>	<b>1</b>	SHIGEMORI <i>et al.</i> , 1992; KOBAYASHI und ISHIBASHI, 1993
<i>Alteromonas</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	Aminosäurederivate		<i>Darwinella rosacea</i>	<b>2</b>	STIERLE und STIERLE, 1992
<i>Pseudomonas</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	Chinolone, Phosphatidylglycerolipid		<i>Homophymia</i> sp.	<b>1, 3, 4</b>	BULTEL-PONCE <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	Chinolone		<i>Suberea creba</i>	<b>3</b>	DEBITUS <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\gamma$ -Proteobacteria	Diketopiperazine		<i>Isodictya setifera</i>	<b>3</b>	JAYATILAKE <i>et al.</i> , 1996
<i>Vibrio</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	Peptid	<b>Andrimid</b>	<i>Hyatella</i> sp.	<b>2</b>	OCLARIT <i>et al.</i> , 1994; 1998
<i>Vibrio</i> sp.	$\gamma$ -Proteobacteria	polybromierte Diphenylether		<i>Dysidea</i> sp.		ELYAKOV <i>et al.</i> , 1991
unzelluläres heterotrophes Bakterium (unident.)	$\gamma$ -Proteobacteria ?	Macrolid	<b>Swinholide A</b>	<i>Theonella swinhoei</i>	<b>1</b>	BEWLEY <i>et al.</i> , 1996
<i>Candidatus Entotheonella palauensis</i>	$\delta$ -Proteobakterium	cyclisches Glycopeptid	<b>Theopalauamid</b>	<i>Theonella swinhoei</i>	<b>1, 5</b>	BEWLEY <i>et al.</i> , 1996; BEWLEY und FAULKNER, 1998; SCHMIDT <i>et al.</i> , 2000
<i>Micrococcus</i> sp.	Actinobacteria	Diketopiperazine		<i>Tedania ignis</i>		STIERLE <i>et al.</i> , 1988
<i>Micrococcus luteus</i>	Actinobacteria	polychlorierte Hydroxydiphenylether		<i>Xestospongia</i> sp.	<b>2</b>	BULTEL-PONCE <i>et al.</i> , 1998
<i>Micromonospora</i> sp.	Actinobacteria	Alkaloid		<i>Clathrina coriacea</i>	<b>1</b>	HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces</i> sp.	Actinobacteria		<b>Urauchimycin</b>	unident.	<b>5</b>	IMAMURA <i>et al.</i> , 1993

1 = zytotoxisch, 2 = antimikrobiell, 3 = antibakteriell, 4 = antiviral, 5 = fungizid; unident. = nicht identifiziert

Wie Tabelle 2.2 zeigt, wurden SAB, die den Cyanobakterien, Proteobakterien und Actinobakterien angehören und verschiedene wirksame Naturstoffe synthetisieren, aus Demospongien isoliert. Bei Experimenten zur antimikrobiellen Wirkung von aus *Aplysina* sp. isolierten Actinobakterien, Firmicutes und Proteobakterien beobachteten HENTSCHEL *et al.* (2001) höchste relative Aktivitäten in Vertretern der Pseudoaltermonadales und der  $\alpha$ -Proteobakterien. IVANOVA *et al.* (1998b) stellten bei umfassenden Untersuchungen mariner Bakterienstämme hohe antimikrobielle Wirkungen in verschiedenen *Pseudoalteromonas*- und *Bacillus*-Arten fest. Eine chemische Analyse der verantwortlichen Sekundärmetaboliten wurde in diesen Arbeiten nicht durchgeführt. Unklar ist auch die Funktion vieler aus SAB bekannter Sekundärmetaboliten für das Ökosystem Schwamm, wenngleich ihre Wirkweisen oftmals darauf hindeuten, dass sie zur Unterstützung des Abwehrsystems von Poriferen genutzt werden.

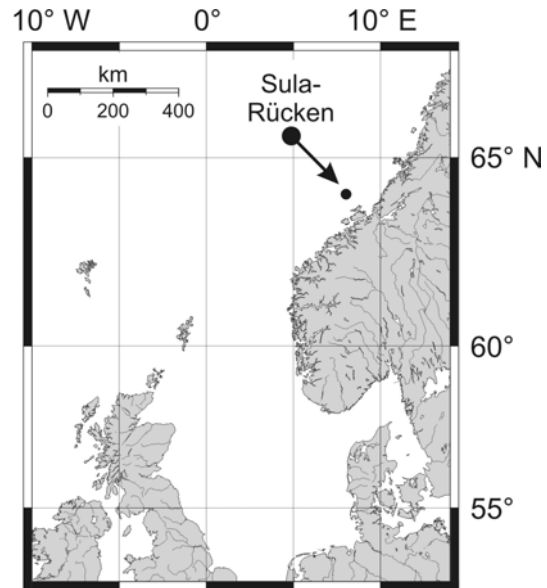
Es wurde festgestellt, dass Art und Konzentration von Sekundärmetaboliten von den Kultivierungsbedingungen der Bakterien abhängen (GALLACHER und BIRKBECK, 1993; CHEN *et al.*, 2000). So beobachtete FENICAL (1993) die Produktion gleicher Diketopiperazine in mehr als 90 % ausgewählter Gram-negativer Bakterien bei der Anzucht in nährstoffreichen Medien. Bekannt ist aber auch, dass verschiedene Arten einer Gattung verschiedene Sekundärstoffe produzieren können. Aufgrund der im Gegensatz zu Schwammkulturen erheblich differenzierten Möglichkeiten zur Stimulierung der Sekundärstoffsynthese sind Bakterien für eine biotechnologische Produktion von Wirkstoffen von besonderer Bedeutung. Das Sekundärstoffpotenzial von Bakterien, die mit einigen der untersuchten Poriferen vergesellschaftet sind, wird daher von verschiedenen Forschergruppen im Rahmen des Projektes BOSMAN intensiv untersucht. Die Suche nach bioaktiven Substanzen in SAM war nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, wenngleich die eingesetzten Verfahren zur Erfassung niedermolekularer, gering funktionalisierter Komponenten geeignet waren.

### 3 Habitatanalyse des Sula-Rückens (Norwegen) und Beschreibung des Probenmaterials

#### 3.1 Habitatanalyse

Der überwiegende Teil des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probenmaterials setzt sich aus Schwämmen der Klasse Demospongiae und mit ihnen vergesellschafteter Bakterien (SAB) vom Sula-Rücken des mittelnorwegischen Tiefschelfs zusammen (Abb. 3.1).

Während einer Ausfahrt mit dem FS ‚POSEIDON‘ (POS 254) wurden die Poriferen mit dem bemannten Tauchboot ‚JAGO‘ im Sommer 1999 gesammelt. Sofort nach der Bergung wurden schwammassoziierte Bakterien auf verschiedenen Medien kultiviert. Zur Beschreibung des Ökosystems am Sula-Rücken wurden während der Ausfahrt umfangreiche seismische Profile und Unterwasservideosequenzen aufgenommen sowie ozeanographische und hydrochemische Messgrößen überprüft. Im Folgenden werden die Ergebnisse eigener physikochemischer Analysen und die allgemeine Geologie und Biologie am Sula-Rücken vorgestellt. Eine Beschreibung der untersuchten Schwammproben, die verschiedenen atlantischen und pazifischen Tiefwasserstandorten entstammen, und der SAB vom Sula-Rücken findet sich am Ende dieses Kapitels.



**Abbildung 3.1** Position des Sula-Rückens auf dem mittelnorwegischen Schelf.

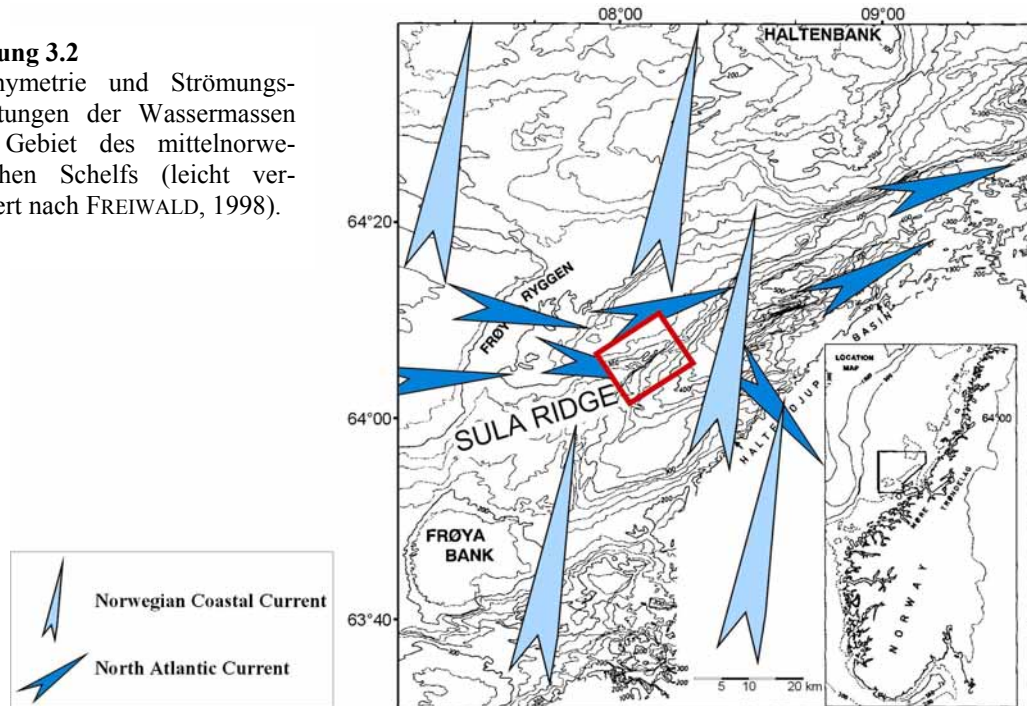
#### 3.1.1 Ozeanographie und Meereschemie am Sula-Rücken

Während der Forschungsfahrt im Sommer 1999 wurden umfassende Datensätze zur Charakterisierung der Milieubedingungen wie die ozeanographischen Basisparameter Salinität, Temperatur und pH aufgenommen. Daneben wurden weitere die Biologie steuernde hydrochemische Eigenschaften, zu denen die Konzentrationen gelösten organischen und anorganischen Kohlenstoffs, verschiedener Nährsalze, gelösten Methans und Sauerstoffs zählen, analysiert.

Bekannt ist, dass zwei verschieden gerichtete Strömungen Wassermassen unterschiedlicher Herkunft in das Gebiet des mittelnorwegischen Schelfs leiten (MORK, 1981). Der Norwegische Küstenstrom (Norwegian Coastal Current, NCC) führt oberflächennah weniger dichte Wassermassen (Salinität < 35) von SSW nach NNE. In den tieferen Bereichen dringt ein topographisch aus W geleiteter Ausläufer des Nordatlantischen Stroms (North Atlantic Current, NAC) in das Riffgebiet ein. Aus dem zentralen Atlantik gespeist, fließt er entlang des europäischen Kontinentalhangs und führt Wassermassen mit Salinitäten > 35 mit sich (s. Abb. 3.2; LJØEN und NAKKEN, 1969; EIDE, 1979).

**Abbildung 3.2**

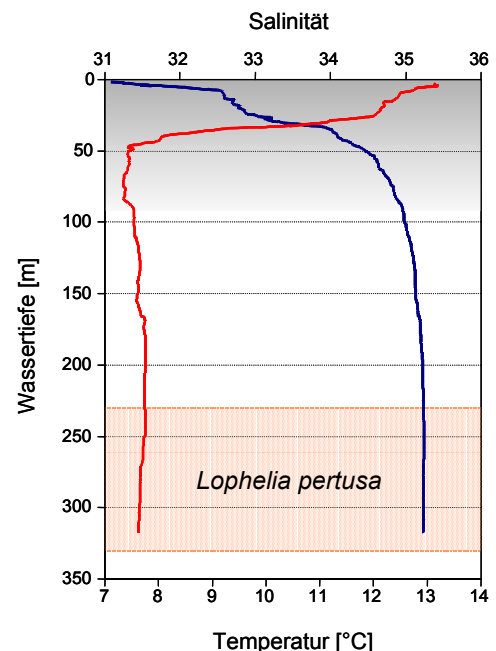
Bathymetrie und Strömungsrichtungen der Wassermassen im Gebiet des mittelnorwegischen Schelfs (leicht verändert nach FREIWALD, 1998).



### Physikochemische Daten

Abb. 3.3 zeigt ein für das Fahrtgebiet Anfang August 1999 typisches Salinität-Temperatur-Profil in unmittelbarer Nähe des Rifffkomplexes. Der Tiefenbereich des Auftretens von *Lophelia pertusa* und assoziierter Poriferen im Gebiet des Sula-Rückens ist im Profil zwischen etwa 230 und 330 m schematisch dargestellt.

Im August 1999 lag die Thermokline zwischen 40 und 50 m. In den bodennahen Wassermassen wurden Temperaturen von etwa 7,6°C gemessen. Die Salinität stieg von der Oberfläche (31,08) bis etwa 150 m Wassertiefe kontinuierlich an, während unterhalb von 150 m relativ konstante Salinitäten (bis zu 35,24) gemessen wurden. Diese Messwerte lassen eine deutliche Stratifizierung der Wassersäule zum Untersuchungszeitpunkt erkennen und ermöglichen die Zuordnung zu den oben genannten Wasserkörpern. Temperatur und Salinität der tieferen Bereiche stimmten mit den Angaben anderer Bearbeiter für die Wassermassen des NAC überein (BLINDHEIM, 1990).



**Abbildung 3.3** Salinität-Temperatur-Profil (Fieren) am Sula-Rücken (64:04:25N, 08:01:60E) August 1999.



Aufgrund der deutlichen Differenzierung sind für die erfassten chemischen Basisparameter beider Wasserkörper verschiedene Ursachen und Umsetzungsprozesse anzunehmen. Aus diesem Grund wird die nachfolgende Betrachtung hydrochemischer Ergebnisse überwiegend auf den für das Korallenriff relevanten Tiefenbereich > 100 m beschränkt.

#### Hydrochemische Daten

Wasserproben für hydrochemische Analysen wurden während acht Schiffsstationen an sieben verschiedenen Lokationen und im Zuge von vier Tauchgängen gesammelt. Eine Übersicht über die Proben und die jeweiligen Messwerte befindet sich in Anh. C und D.

#### In-situ-pH-Werte

Die *in-situ*-pH-Werte in verschiedenen Tiefenbereichen am Sula-Rücken zeigt Abb. 3.4.

Das Verteilungsmuster der *in-situ*-pH-Werte ähnelt dem Temperaturprofil der Wassersäule. Es wird vermutet, dass dieser Parameter prinzipiell von der Zusammensetzung oben beschriebener Wasserkörper kontrolliert wird. Maximale pH-Werte (bis 8,26) wurden in der oberflächennahen Wasserschicht des NCC gemessen. Wasserproben zwischen 50 und 335 m wiesen relativ konstante Werte (pH 8,11 bis 8,18) auf. Der geringste pH lag in Bodennähe außerhalb des zentralen Riffbereichs bei 344 m. Im Allgemeinen wurden am Sula-Rücken für den marinen Bereich typische pH-Werte gemessen.

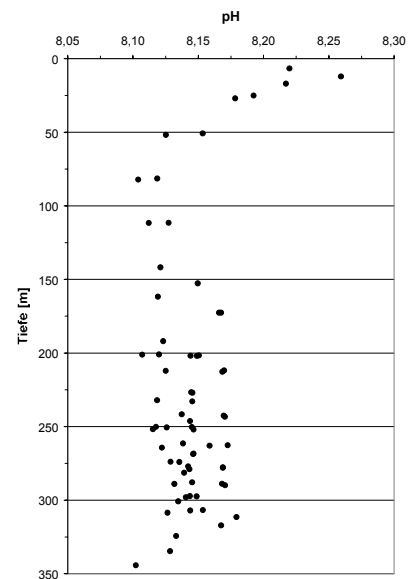


Abbildung 3.4 *In-situ*-pH-Werte am Sula-Rücken.

#### Gelöster anorganischer Kohlenstoff (DIC)

Die Konzentrationen gelösten anorganischen Kohlenstoffs ( $\Sigma\text{CO}_2 = [\text{CO}_2^*_{(\text{aq})}] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}]$ ) in Wassertiefen > 100 m lagen zwischen etwa 2.120 und 2.138  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  ( $n = 72$ , ohne Abb.). Unterschiede der DIC-Gehalte zwischen riff- oder bodennahen Wasserproben und darüber liegenden Wassermassen waren nicht erkennbar. Die erfassten DIC-Konzentrationen sind für nordatlantische Wassermassen gleicher Tiefe übliche Werte (LIBES, 1992). Sie stimmen gut mit den von THOMAS (2002) für den zentralen Nordatlantik angegebenen Daten überein.

#### Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Die DOC-Konzentrationen der Wasserproben aus Tiefen > 100 m ( $n = 53$ ) streuten zwischen 35,8 und 128,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (o. Abb.). Eine gerichtete Verteilung der Gehalte an gelöstem organischem Kohlenstoff in der Wassersäule war nicht festzustellen. Im Vergleich zu den Literaturangaben für DOC-Konzentrationen mariner Wassermassen lagen am Sula-Rücken für den Nordatlantik bzw. offene Ozeangebiete anderer Regionen übliche Werte vor (THURMAN, 1985; MARTIN und FITZWATER, 1992; ARCHER *et al.*, 1997; AMON *et al.*, 2003).

### 3 Habitatanalyse des Sula-Rückens und Beschreibung des Probenmaterials

#### Nährstoffe

Die Konzentrationen der in Tabelle 3.1 angegebenen Nährstoffe wurden im Umgebungswasser des *Lophelien*-Riffs bestimmt. Spezifische Verteilungsmuster der Nährsalze innerhalb der Wassersäule ermöglichten die Klassifizierung typischer Konzentrationsbereiche.

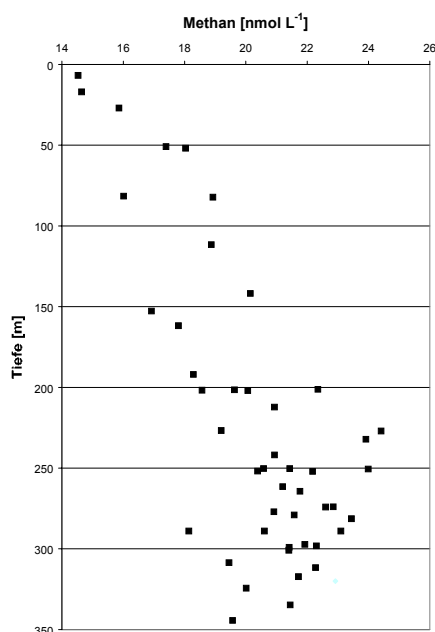
**Tabelle 3.1** Konzentrationsbereiche ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ) der Nährstoffe am Sula-Rücken ( $n = 63$ ).

Tiefe [m]	Silikat	Ammonium	Nitrit	Nitrat	Phosphat
0–50	< 0,2–3,3	0,46–1,10	0,05–0,11	< 0,2–4,8	0,02–0,08
50–150	3,3–7,8	0,51–1,03	0,04–0,29	< 0,2–10,9	0,04–0,97
150–350	5,3–11,9	0,46–1,28	0,04–0,36	< 0,2–13,3	0,04–1,08

Im Allgemeinen streuten die Nährstoffkonzentrationen am Sula-Rücken unterhalb von 150 m in für nordatlantisches Wasser dieser Tiefe üblichen Bereichen (BROECKER und PENG, 1982; THOMAS, 2002) und stiegen tendenziell mit zunehmender Wassertiefe. Mit Ausnahme von Nitrit (192 m) wurden alle Maximalwerte in Tiefen zwischen 260 und 280 m gemessen. Nitrat und Phosphat waren vermutlich infolge ihrer Fixierung durch Primärproduzenten im Oberflächenwasser relativ abgereichert. Basierend auf diesen Messwerten ist von einem guten Nährstoffangebot für das Gebiet des Sula-Rückens auszugehen.

#### Gelöster Sauerstoff

Die Konzentrationen gelösten Sauerstoffs lagen im Beprobungszeitraum zwischen etwa 240 und 280  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , wobei der Maximalwert nahe der Oberfläche (17 m Wassertiefe) gemessen wurde. Ein tiefenbezogener Gradient der Konzentrationen in der Wassersäule war nicht erkennbar, und für den überwiegenden Teil (60 %) der Proben ( $n = 41$ ) wurden Sauerstoffkonzentrationen  $\geq 264 \mu\text{mol L}^{-1}$  gemessen. Die Messwerte zeigen eine gute bis sehr gute  $\text{O}_2$ -Verfügbarkeit für die Fauna des Sula-Rückens an.



#### Gelöstes Methan

Die Konzentrationen von gelöstem  $\text{CH}_4$  nahmen generell mit zunehmender Wassertiefe zu (Abb. 3.5). Die oberflächennahen Proben enthielten etwa 14,5  $\text{nmol L}^{-1}$  und die höchste Konzentration (24,4  $\text{nmol L}^{-1}$ ) wurde in 227 m Tiefe gemessen. Unterhalb von 230 m wurde eine geringfügige Abnahme der  $\text{CH}_4$ -Konzentrationen beobachtet.

Im Vergleich mit den Literaturangaben für andere marine Habitate sind die Konzentrationen von gelöstem  $\text{CH}_4$  im Bereich des Sula-Rückens signifikant erhöht (vgl. z.B. KELLEY und JEFFREY, 2002).

**Abbildung 3.5**  $\text{CH}_4$ -Konzentrationen am Sula-Rücken.

#### Diskussion

Alle physiko- und hydrochemischen Daten am Sula-Rücken zeigten mit Ausnahme von gelöstem CH<sub>4</sub> gewöhnliche Konzentrationen und Verteilungsmuster, die den Wassermassen des NCC und NAC zuzuordnen sind. Insbesondere im Bereich unterhalb von 200 m lagen relativ konstante Messwerte vor. Für die Salinität und die Temperatur wurden ähnliche Bedingungen auch bei einer früheren Ausfahrt im Herbst 1995 beobachtet (FREIWALD *et al.*, 2002). Unter der Voraussetzung, dass eine Thermokline im Jahresverlauf zwischen etwa 50 m und 200 m positioniert ist und der NAC generell Wassermassen relativ homogener chemischer Zusammensetzung heranführt, kann von konstanten Milieubedingungen für die Fauna am Sula-Rücken ausgegangen werden.

Die Konzentration von gelöstem CH<sub>4</sub> ist mit etwa 22 nmol L<sup>-1</sup> in bodennahen Wasserproben signifikant gegenüber den Gehalten in entsprechenden Tiefen des offenen Ozeans erhöht. Diese Beobachtung kann möglicherweise auf den regionalen Eintrag aus *Mikroseepages* bzw. angrenzenden Biofossil-Lagerstätten zurückgeführt werden (s. Kapitel 3.1.2).

In neueren Arbeiten wurde das Auftreten von Kaltwasserkorallenriffen auf dem mittelnorwegischen Schelf im direkten Zusammenhang mit Exhalationen leichtflüchtiger KW in Form von *Mikroseepages* diskutiert (HOVLAND und THOMSEN, 1997; HOVLAND *et al.*, 1998). Jedoch zeigen die Messwerte der vorliegenden Arbeit für DIC und insbesondere CH<sub>4</sub> bodennah keine deutlich erhöhten Werte, so dass signifikante Einflüsse endogener Prozesse auf das lokal begrenzte Auftreten der Korallen am Sula-Rücken in diesem Fall unwahrscheinlich erscheinen.

#### **3.1.2 Allgemeine Geologie und Biologie des Sula-Rückens**

Der Sula-Rücken (64°N, 8°E) befindet sich auf dem mittelnorwegischen Schelf etwa 80 km vor Trondheim in 250 bis 320 m Wassertiefe. Als morphologische Verlängerung einer lokalen Erhebung, der Frøya-Bank, zeigt der Sula-Rücken eine generelle SW-NE-Erstreckung (Abb. 3.2).

Der Rücken besteht im Wesentlichen aus ausstreichenden Sandsteinen des Paläozäns, die ein lokal begrenztes Hartsubstrat bilden (BUGGE *et al.*, 1984). Mehrere morphologische Depressionen, deren Untergrund sich aus leicht erodierbaren Sedimentgesteinen des Meso- und Känozoikums zusammensetzt, finden sich mit Tiefen zwischen 340 und 400 m in der näheren Umgebung des Sula-Rückens (BUGGE *et al.*, 1984; HAFLIDASON *et al.*, 1991). In diesen Becken wurden gehäuft *Pockmarks* mit Gas- bzw. Fluidaustritten beobachtet, die von Porenwasser- und KW-Reservoirs des Untergrunds gespeist werden (HOVLAND *et al.*, 1998). Mehrere umfassende Erdöl- und Gaslagerstätten, die sich in der Region um den Sula-Rücken befinden, werden zur Zeit exploriert (EHRENBORG *et al.*, 1995; KARLSEN *et al.*, 1995).

Insbesondere an der nordwestlichen Flanke des Sula-Rückens wurden bis in Tiefen von 300 m Eisberg-Pflugmarken des Spät- bis Postglazials festgestellt, deren Furchen sich bis etwa 10 m in den Meeresboden einschneiden (LIEN, 1983). Die bei der Driftbewegung entstandenen Wälle sind wiederum bis zu 5 m gegenüber dem Gelände erhöht und setzen sich aus erodierten Sandsteinen und tonig-lehmigen Sedimenten zusammen (FREIWALD *et al.*, 1999). Gleichzeitig kam es zu einem starken Eintrag von *Dropstones* auf Teilen des mittelnorwegischen Schelfs. In der weiteren Folge wurden dem Gebiet um den Sula-Rücken vermutlich während des zweiten *Storegga slide events* vor etwa 7.200 Jahren Suspensionsfrachten aus nordwestlicher Richtung zugeführt, was neben der Anlieferung von Korallenfragmenten eine teilweise Verfüllung der Furchen zur Folge hatte (BUGGE *et al.*, 1987; DAWSON *et al.*, 1988; LONG *et al.*, 1989; BONDEVİK *et al.*, 1997).

### 3 Habitatanalyse des Sula-Rückens und Beschreibung des Probenmaterials

---

Hauptriffbildner des Bioherms am Sula-Rücken sind die scleractinen Kaltwasserkorallenarten *Lophelia pertusa* und mit geringeren Anteilen *Madrepora oculata*. *L. pertusa* ist befähigt, die für die Skelettbildung benötigte Kalkfällung ohne Beteiligung photosynthetischer, endodermaler Mikrobionten (azooxanthellat) durchzuführen, so dass sich Korallen dieser Spezies in allen Weltmeeren und besonders im nördlichen Atlantik in aphotischen Wassertiefen von 250 bis 500 m mit weiter Verbreitung und großer Besiedlungsdichte finden (MORTENSEN *et al.*, 1995; MORTENSEN *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2003, und darin genannte Zitate). Die Ursachen der Verteilungsmuster von *L. pertusa* sind nicht abschließend geklärt und es werden verschiedene Faktoren diskutiert. Neben der Annahme einer benthopelagischen Kopplung, für die ein abwärts gerichteter Eintrag pelagischer Nahrungspartikel zu Grunde gelegt wird, wird in diesem Zusammenhang häufig die an *Seeps* leichter KW gebundene Nährstoff-Hypothese genannt (BROOKS *et al.*, 1987; CARY *et al.*, 1988; GREBMEIER und BARRY, 1991). Die letztgenannte Theorie wurde dabei insbesondere auf Grundlage der Beobachtung einer deutlichen Häufung von *L.-pertusa*-Riffen an Standorten erhöhter KW-Gehalte in Sedimenten erstellt (HOVLAND und THOMSEN, 1997; HOVLAND *et al.*, 1998). Eindeutige Beweise für beide Annahmen liegen bis heute hingegen nicht vor.

Durch detaillierte Studien sind dagegen anderen Standortfaktoren, die essentiell für die Besiedlung durch *L. pertusa* sind, zweifelsfrei aufgeklärt. Zu diesen gehören u.a. die Präsenz eines lokalen Hartsubstrats (DONS, 1944; FREIWALD *et al.*, 1999), ganzjährig stabile physikochemische Eigenschaften des Umgebungswassers (wie T zwischen 4 und 12°C, Sal > 34, O<sub>2</sub> > 3 mg L<sup>-1</sup>; FREDERIKSEN *et al.*, 1992; FREIWALD, 1998; MORTENSEN *et al.*, 2001), ein Tiefenbereich unterhalb der Sturmwellenbasis (FREDERIKSEN *et al.*, 1992) sowie lokal erhöhte Wasserströmungen (am Sula-Rücken bis etwa 40 cm s<sup>-1</sup>; EIDE, 1979; FREDERIKSEN *et al.*, 1992). Ferner wurde das bevorzugte Auftreten von *L. pertusa* in spezifischen Wassermassen regional höchster Salinität festgestellt. Wie die ozeanographischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, lagen im Sommer 1999 für verschiedene hydrochemische Messgrößen im Tiefenbereich des Korallenriffs für marine Bereiche übliche Werte vor (s. Kapitel 3.1). Eine Ausnahme bildeten die CH<sub>4</sub>-Konzentrationen, die im Vergleich zu den üblichen Messwerten in marinen Gebieten entsprechender Tiefe deutlich erhöht waren.

Das Bioherm am Sula-Rücken ist Teil eines den nordeuropäischen Schelfhang von der iberischen Halbinsel bis zum nordnorwegischen Tiefschelfgebiet begleitenden Kaltwasserkorallengürtels. Mit einer Längserstreckung von mindestens 13 km, einer Breite von bis zu 300 m und einer relativen Höhe von 15 bis 35 m ist der Riffkomplex eines der größten bekannten Tiefwasserkorallenriffe im Nordostatlantik (HOVLAND und THOMSEN, 1997; FREIWALD *et al.*, 1999; MORTENSEN *et al.*, 2001). Der Beginn der Besiedlung des Hartsubstrats durch *L. pertusa* ist seit etwa 8.600 Jahren (frühes Holozän) belegt (HOVLAND *et al.*, 1998). Die Vorkommen der Kaltwasserkorallen liegen heute in Wassertiefen zwischen 233 und 315 m.

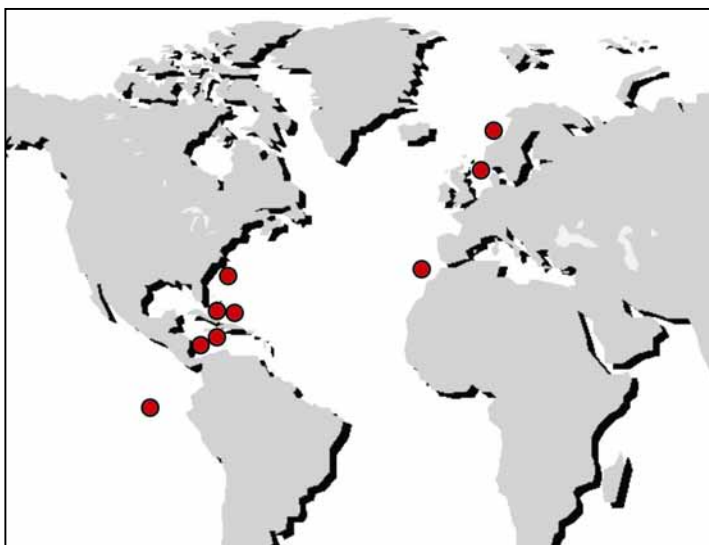
Am Sula-Rücken findet sich eine hoch diverse Makrofauna vergesellschafteter Invertebraten, die sich u.a. aus Poriferen, Cnidarien, Crustaceen, Echinodermaten, Mollusken, Bryozoen und Polychaeten zusammensetzt (JENSEN und FREDERIKSEN, 1992; MORTENSEN *et al.*, 1995). Schwämme, überwiegend der Klasse Demospongiae, stellen dabei die vorherrschende Biomasse des Ökosystems. Ferner finden sich in der Region viele Fischarten, von denen insbesondere juvenile Exemplare die benthische Makrofauna zur Deckung nutzen.

Kartierarbeiten mit *Sidescan-Sonar* und umfangreiche Unterwasser-Videodokumentationen während der Expedition im Sommer 1999 und früherer Ausfahrten zeigten eine klare Zonierung der benthischen Besiedlung in der Region an, die im Wesentlichen durch das Auftreten von Korallenhartteilen gesteuert wird (MORTENSEN *et al.*, 1995; FREIWALD *et al.*, 2002). Vom zentralen Riffbereich bis zur Basis des Bioherms können nach MORTENSEN *et al.* (1995) allgemein folgende Biozonen ausgegliedert werden: (i) aufgerichtete Strukturen lebender Korallen, (ii) zerbrochene Stöcke abgestorbener Korallen und (iii) Fragmente aus Korallenschutt (*coral rubble*). Auffallend ist weiterhin ein starkes *Lophelien*-Wachstum auf den Wällen der Eisberg-Pflugmarken.

Analog der Verteilung der Korallen ist auch das Auftreten riffassoziiierter Poriferen zoniert. Während die größte Dichte an voluminösen Schwämmen wie der Gattung *Geodia* auf unbesetzten Stellen der Riffflanken festgestellt wurden, scheinen flachere bzw. inkrustierende Formen wie z.B. *Plakortis simplex* das Wachstum auf Korallenschutt zu bevorzugen. Andere Arten wie *Oceanapia robusta* oder *Thenia muricata* sind dagegen ausschließlich zur Besiedlung von Weichsubstrat, das in vereinzelt Riffzwischenräumen und in riffabgelegenen Arealen hervortritt, befähigt. Darüber hinaus dienen gestreute *Dropstones* als Hartsubstrat für Schwämme wie *Phakellia ventilabrum* und andere Benthonten, die oftmals auch von anderen Gebieten des nördlichen Atlantiks bekannt sind (OSCHMANN, 1990; MORTENSEN *et al.*, 1995).

## 3.2 Das Probenmaterial

### 3.2.1 Poriferen



Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen mikrobieller Lipide in Schwämmen ist ein umfangreicher Probenfundus, der mehr als 50 Spezies der Porifera-Klassen Hexactinellida und Demospongiae verschiedener Habitate umfasst (Abb. 3.6).

**Abbildung 3.6** Beprobungslokalitäten der untersuchten Schwämme.

### 3 Habitatanalyse des Sula-Rückens und Beschreibung des Probenmaterials

---

Der überwiegende Teil der untersuchten Spezies wurde während der Forschungsfahrt zum Sula-Rücken auf dem mittelnorwegischen Schelf im Sommer 1999 mit dem Tauchboot ‚JAGO‘ geborgen. Das am Sula-Rücken aus Wassertiefen um 300 m gewonnene Probenmaterial umfasst im Wesentlichen Angehörige der Demospongiae. Die taxonomische Klassifizierung der Poriferen vom Sula-Rücken wurden von Prof. Dr. J. Reitner und Dr. F. Hoffmann des *Geowissenschaftlichen Zentrums, Abteilung Geobiologie der Universität Göttingen* sowie Dr. R. W. M. van Soest vom *Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam* durchgeführt.

Während eines Forschungsaufenthaltes an der *Marinbiologisk Station* in Espeland bei Bergen (Norwegen) im Oktober und November 2001 wurden weiterhin durch den Einsatz einer Dreiecks-dredge im Korsfjord sechs Demospongiae-Arten aus 100 bis 200 m Tiefe gesammelt.

Von der *Division of Biomedical Marine Research* (Dr. S. A. Pomponi und J. Reed) der *Harbor Branch Oceanographic Institution* (HBOI) in Fort Pierce, Florida wurden 20 Hexactinelliden-Spezies, die bei zahlreichen Ausfahrten in den Jahren 1986 bis 1995 mit Hilfe von Tauchbooten in verschiedenen Regionen und Wassertiefen zwischen 215 und 860 m beprobt wurden, bereitgestellt.

Eine Liste aller untersuchten Poriferen, ihrer geographischen Herkunft und der Wassertiefen ist im Anhang gegeben. Der überwiegende Teil der in dieser Arbeit untersuchten Hexactinellida und Demospongiae wurden aus Tiefen  $> 250$  m, also unterhalb der euphotischen Zone, geborgen. Für die meisten der analysierten Poriferen sind ferner an ihren Standorten ganzjährig Umgebungstemperaturen  $< 15$  °C zu vermuten, so dass sowohl die Poriferen als auch die aus ihnen gewonnenen Bakterien in diesen Fällen als Kälte liebend (psychrophil bzw. psychrotroph) bezeichnet werden. Wie sich ferner zeigte, sind Beiträge obligat phototropher Organismen (wie Cyanobacteria oder Algen), wie sie von anderen Poriferen bekannt sind, in den bearbeiteten Hexactinellida und Demospongiae vernachlässigbar.

#### 3.2.2 Bakterien

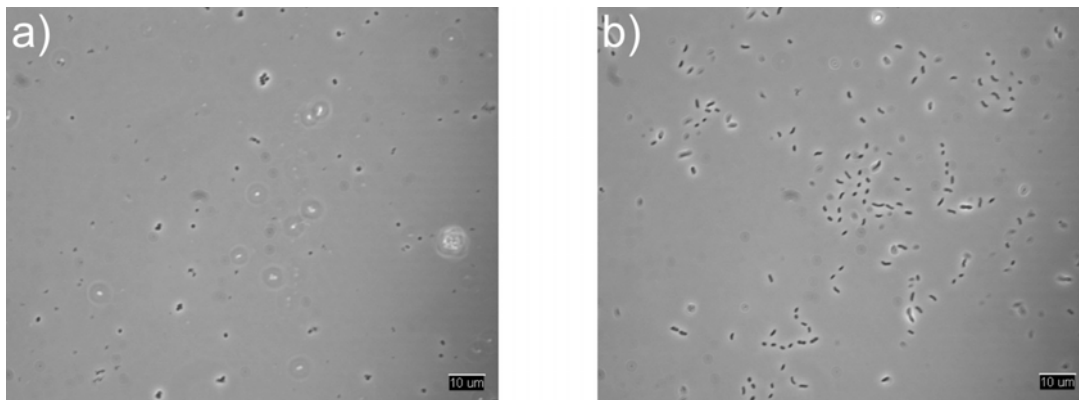
Während der Ausfahrt zum Sula-Rücken wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. U. Szewzyk (*Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen, Technische Universität Berlin*) Bakterien aus ausgewählten Demospongiae-Homogenisaten aerob und anaerob auf verschiedenen Voll- und Selektivmedien kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 8°C. Aus dem vorliegenden Inventar aerober schwammassoziierter Bakterien – vornehmlich Angehörige der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria – wurden für diese Arbeit etwa 50 Isolate bezüglich ihrer phylogenetischen Eigenschaften ausgewählt und hinsichtlich ihrer Membranlipide untersucht (Kapitel 4). Die phylogenetische Charakterisierung der Isolate erfolgte durch Teilsequenzierung der 16S-rRNA und Implementierung der Datensätze in die Auswertungssoftwarepakete GenBank und ARB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> und <http://www.arb-home.de/>; Stand jeweils 2000). Die hier verwendeten taxonomischen Bezeichnungen der Isolate basieren auf den Klassifizierungen nach ARB.

Die untersuchten Bakterien wurden aus den in Tabelle 3.2 aufgeführten Demospongiae-Spezies gewonnen.

Tabelle 3.2 Schwammspezies, aus denen die untersuchten SAB isoliert wurden.

Porifera	Proben- bezeichnung	Kürzel des Bakterienisolates
<b>Homoscleromorpha</b>		
<i>Plakortis</i> sp.	18J1-10	P...
<b>Tetractinomorpha</b>		
<i>Isops phlegraei</i>	26J1-2	Geo...
<i>Polymastia sol</i>	32J2-5	PS...
<b>Ceractinomorpha</b>		
<i>Phakellia ventilabrum</i>	20J2-4	Ph...
<i>Haliclona</i> sp. 1	18J1-6	Hal ...
<i>Oceanapia robusta</i>	26J1-12	OR...

Eine Übersicht über die morphologischen und physiologischen Eigenschaften der untersuchten Proteobakterien gibt Tabelle 3.3. Exemplarisch sind mikroskopische Aufnahmen von schwamm-assoziierten Proteobakterien in Abb. 3.7 dargestellt



**Abbildung 3.7** Übersichtsaufnahmen von Bakterienisolaten aus *Isops phlegraei*.  
a) *Roseobacter* sp. ( $\alpha$ -Proteobacteria) b) *Pseudoalteromonas* sp. ( $\gamma$ -Proteobacteria).  
(Bildmaterial: AG Prof. Szewzyk, TU Berlin).

Mit den untersuchten Bakterienstämmen wurden alle zum Zeitpunkt der Analysen vorliegenden phylogenetischen Klassen erfasst. Reinkulturen obligat anaerober SAB lagen für Untersuchungen in dieser Arbeit nicht vor.

Ein Isolat des gut untersuchten aeroben  $\alpha$ -Proteobakteriums *Gluconacetobacter xylinus* (synonym *Acetobacter xylinum*) wurde von Prof. Dr. M. Rohmer (*Faculté de Chimie, Institut Le Bel, Université Louis Pasteur, Strasbourg*) als Referenzorganismus für die Aufbereitung und Analyse von Hopanoiden (Kapitel 5.4) zur Verfügung gestellt.

Eine Liste der analysierten Bakterien ist dem Anhang dieser Arbeit beigelegt.

Tabelle 3.3 Vorkommen und Physiologie untersuchter Gattungen der Proteobacteria.

Gattung	Vorkommen	O <sub>2</sub> -Bedarf	Ernährung	Zellform	max. Zellgröße [µm]	Quellen
<b>Sphingomonas</b>	ubiquitär	aerob	fakultativ phototroph	stäbchenförmig	0,3–0,8 x 1,0–2,7	YABUUCHI <i>et al.</i> , 1990
<b>Erythrobacter</b>	marin	aerob	chemoorganotroph	ovoid bis stäbchenförmig	0,5 x 1,0–5,0	SHIBA und SIMIDU, 1982; YURKOV und BEATTY, 1998; KOBLIŽEK <i>et al.</i> , 2003
<b>Roseobacter</b>	marin	aerob	phototroph	ovoid bis stäbchenförmig	0,9 x 2,0	LAFAY <i>et al.</i> , 1995; YURKOV und BEATTY, 1998
<b>Rhodobacter</b>	aquatisch	aerob, mikroaerophil, fakultativ anaerob	phototroph	ovoid bis stäbchenförmig		HANSEN und IMHOFF, 1985; UCHINO <i>et al.</i> , 1998; ADDESEE und HUNTER, 1999
<b>Pseudomonas</b>	ubiquitär	aerob				
<b>Vibrio</b>	häufig marin	fakultativ anaerob		stäbchenförmig, gekrümmt bis gerade		OKUYAMA <i>et al.</i> , 1984
<b>Alteromonas</b>	marin	strikt aerob	chemoorganotroph	stäbchenförmig, gekrümmt bis gerade	0,7–1,0 x 2,0–3,0	BAUMANN <i>et al.</i> , 1984; GAUTHIER <i>et al.</i> , 1995
<b>Colwellia</b>		fakultativ anaerob		gekrümmte Stäbchen		YUMOTO <i>et al.</i> , 1998
<b>Marinobacter</b>		aerob		ovoid bis stäbchenförmig		GAUTHIER <i>et al.</i> , 1992
<b>Pseudoalteromonas</b>	marin	strikt aerob	chemoorganotroph	stäbchenförmig, gekrümmt bis gerade	0,2–1,5 x 1,8–3,0	AKAGAWA-MATSUSHITA <i>et al.</i> , 1992; GAUTHIER <i>et al.</i> , 1995; IVANOVA <i>et al.</i> , 2002



#### 3.2.3 Archaeen

Von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. G. Antranikian (*Institut für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität Hamburg-Harburg*) wurden Zellen des aeroben thermoacidophilen Crenarchaeons *Sulfolobus solfataricus* (obsolet *Caldariella acidophila*) als Modellorganismus für die Aufbereitung und Analyse von Dialkylglyceroltetraethern (Kapitel 6.2.2) bereitgestellt.

Die phylogenetische Klassifizierung der in dieser Arbeit genannten Prokaryota stützt sich im Wesentlichen auf die Einordnungen im *Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera* (2<sup>nd</sup> Edition, Rel. 1.0) des *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (GARRITY *et al.*, 2001).



## 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

Viele Bakterien synthetisieren Membranlipide in für ihr Taxon typischen Verteilungen. Zahlreiche Untersuchungen an Bakterienreinkulturen zeigen, dass sich deren Phospholipid-Zusammensetzung sowie Verteilungsmuster der Carbonsäuren zu ihrer chemotaxonomischen Klassifizierung eignen (UEKI und SUTO, 1979; BOWMAN *et al.*, 1991; THOMPSON *et al.*, 1993; HAACK *et al.*, 1994; SVETASHEV *et al.*, 1995; BERTONE *et al.*, 1996; VANCANNEYT *et al.*, 1996; IVANOVA *et al.*, 2000). Das gilt im Besonderen für so genannte Signaturlipide, die infolge ihres begrenzten Auftretens Markerverbindungen für individuelle Bakterientaxa sind. Da Bakterien im Gegensatz zu Eukaryoten keine Reservefette in Form der Triacylglyceride bilden, befinden sich bakterielle Carbonsäuren nahezu ausnahmslos in den Membranlipiden.

In vielen Studien hat sich die Analyse der Carbonsäurefraktion als rasche und kostengünstige Methode zur Charakterisierung bakterieller Populationen, ihrer physiologischen Stadien und auch zur Abschätzung ihrer Biomasse in marinen und terrestrischen Proben erwiesen (PERRY *et al.*, 1979; VOLKMAN *et al.*, 1980; GILLAN und HOGG, 1984; GUCKERT *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1986; WELCH, 1991; RAJENDRAN *et al.*, 1992). Für Poriferen wurde dieser methodische Ansatz zur Erfassung mikrobieller Populationen hingegen nur in wenigen Arbeiten verfolgt, und Zuordnungen ausgewählter Lipidbiomarker zu Mikroorganismen taxata wurden nur vereinzelt vorgenommen (WALKUP *et al.*, 1981; AYANOGLU *et al.*, 1982; GILLAN *et al.*, 1988; GARSON *et al.*, 1994; THIEL, 1997; THIEL *et al.*, 1999a; CARBALLEIRA und PAGÁN, 2001). Eine umfassende Charakterisierung bakterieller Populationen in Poriferen anhand des Lipidinventars, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, liegt bislang noch nicht vor.

### 4.1 Phylogenie

Zur Differenzierung der Produzenten – Wirtsorganismus oder assoziierte Bakterien – der in den Poriferen beobachteten Fettsäuren (FA) wurden die Membranlipide ausgewählter Kultivate von SAB untersucht. SAB wurden aus verschiedenen Demospongien während einer Ausfahrt zum Sula-Rücken (Sommer 1999) von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. U. Szewzyk, *TU Berlin*, auf verschiedenen Medien kultiviert. Für die Charakterisierung ihrer Lipidbiomarker wurde Zellmaterial von 46 Reinkulturen aerober bzw. fakultativ anaerober Bakterien zur Verfügung gestellt. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die untersuchten Bakterienstämme. Eine Aufstellung der Spezies findet sich in Anh. B.

Die phylogenetische Klassifizierung der Isolate erfolgte durch Analyse der 16S-rRNA-Gensequenz. Aus Übersichtsgründen wurden in dieser Arbeit, mit Ausnahme des Repräsentanten der Firmicutes, Bakterienstämme mit Sequenzhomologien von mehr als 92 % als Angehörige bekannter Arten angesprochen.

#### 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

Die untersuchten Bakterien gehören den Phyla der Gram-negativen Proteobacteria (Klassen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria) sowie den Gram-positiven Firmicutes (Klasse Bacilli) an. Diese Gruppen sind mit diversen Angehörigen sowohl von marinen Habitaten im Allgemeinen als auch von Poriferen bekannt (s. Kapitel 2.2.1 und 2.5.1).

Für viele Angehörige dieser Taxa anderer Provenienz ist zwar ihr Lipidchemismus in Laborkultur untersucht (z.B. O'LEARY und WILLKINSON, 1988; WILKINSON, 1988; KANEDA, 1991; BERTONE *et al.*, 1996; VANCANNEYT *et al.*, 1996), jedoch der von SAB im Speziellen noch nicht überprüft worden. FA von SAB wurden lediglich für die aus einem Vertreter der ceractinomorphen Schwammfamilie der Irciniidae isolierten *Pseudoalteromas* spp. untersucht (IVANOVA *et al.*, 2002).

Phylum	Klasse	Ordnung	Gattung	
Proteobacteria	$\alpha$ -Proteobacteria		$\alpha$ -Proteobakterium sp.	
		Sphingomonadales	<i>Erythrobacter</i> <i>Sphingomonas</i>	
		Rhodobacterales	<i>Rhodobacter</i> <i>Roseobacter</i>	
		$\gamma$ -Proteobacteria		$\gamma$ -Proteobakterium sp. 1 $\gamma$ -Proteobakterium sp. 2
			Alteromonadales	<i>Alteromonas</i> <i>Colwellia</i> <i>Marinobacter</i> <i>Pseudoalteromonas</i>
		Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i>	
		Vibrionales	<i>Vibrio splendidus</i>	
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Bacillus</i> sp.

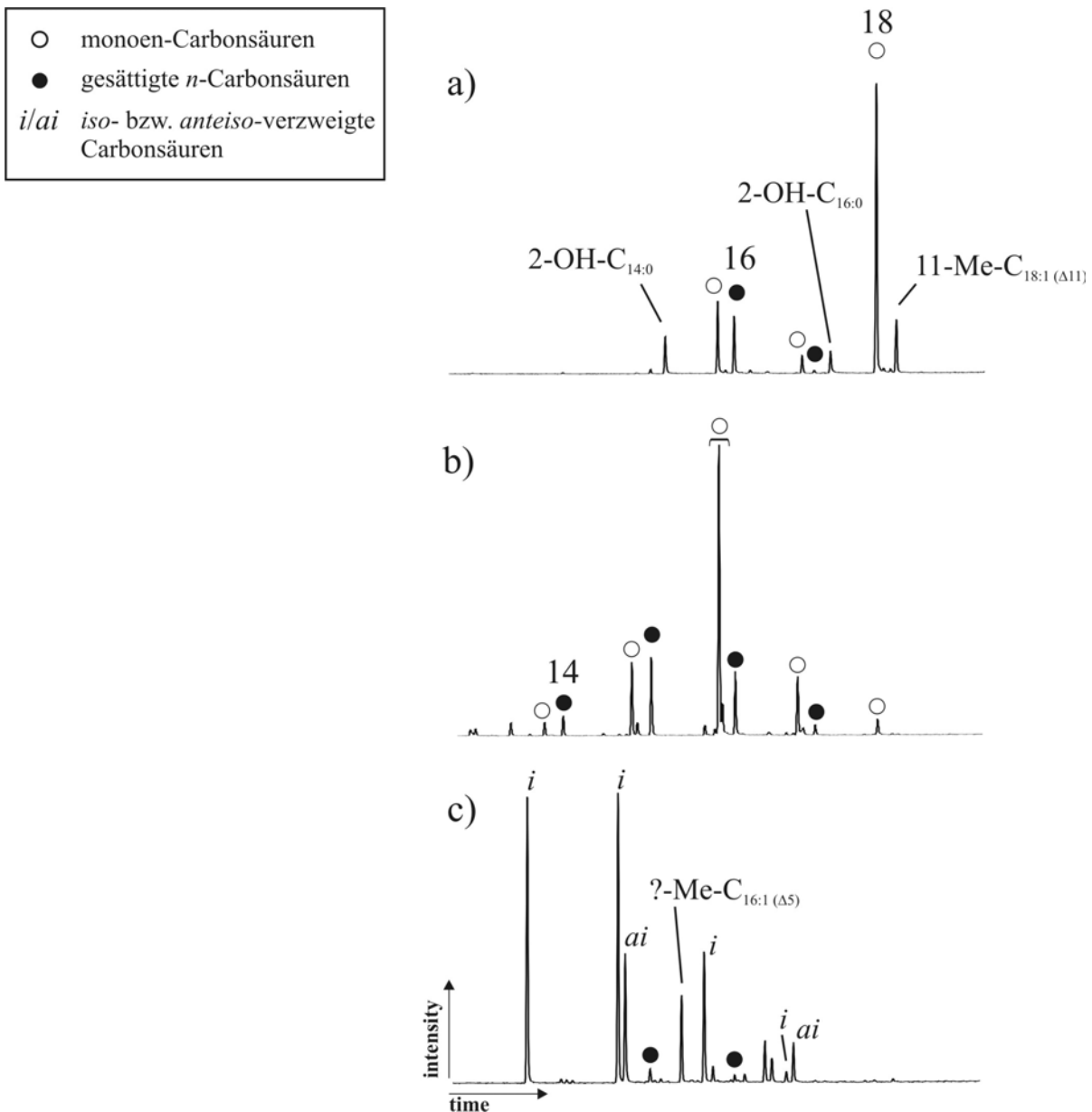
**Tabelle 4.1** Phylogenetische Zugehörigkeit der analysierten Kulturen schwammassoziiierter Bakterien basierend auf der 16S-rRNA-Teilsequenzanalyse.

## 4.2 Lipide

Im Zellhydrolysat der untersuchten Bakterienkulturen wurden gemeinhin FA mit 10 bis 19 C-Atomen (short chain fatty acids, SCFA) beobachtet. Neben gesättigten und einfach ungesättigten *n*-Carbonsäuren wurden untergeordnet zweifach ungesättigte *n*-Carbonsäuren, *n*-Hydroxy- und methylverzweigte Carbonsäuren in den für die jeweiligen Bakterientaxa typischen Verteilungsmustern aufgefunden.

In den Hydrolysaten der Wachstumsmedien wurden diese Verbindungen nicht gefunden, so dass sie als Syntheseprodukte der Bakterien anzusehen sind. Die Quantifizierung der Carbonsäurefraktion mit Hilfe interner Standards ergab beispielsweise für verschiedene Arten der Gattung *Pseudomonas* ( $n = 6$ ) Gehalte zwischen 14,9 und 38,6 [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ] Zelltrockenmasse. Diese Ausbeute ähnelt den Carbonsäuregehalten in weiteren Bakterien verschiedener phylogenetischer Position (GILLAN und HOGG, 1984; HAACK *et al.*, 1994).

Wie aus Tabelle C2 (Anh.) zu erkennen ist, konnten mehr als 40 Verbindungen strukturell klassifiziert werden. In Abb. 4.1 sind exemplarisch die gaschromatographischen Messläufe der Fraktionen hydrolysierter Lipide je eines Vertreters der  $\alpha$ - und der  $\gamma$ -Proteobacteria sowie der Bacilli gezeigt.



**Abbildung 4.1** Partielle Gaschromatogramme der FAME-Fractionen aus  
 a) *Erythrobacter longus* (Hal CSA 60,  $\alpha$ -Proteobacteria),  
 b) *Pseudoalteromonas carrageenovora* (P MBA 229h,  $\gamma$ -Proteobacteria) und  
 c) *Bacillus* sp. (P MBA 215, Firmicutes);  
 Zahlen geben die Anzahl der C-Atome an.

Ein Vergleich der in allen Bakterien auftretenden Carbonsäureklassen zeigt, dass signifikante qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den jeweiligen Gattungen vorliegen. Innerhalb der Gattungen wurden typische Verteilungen mit chemotaxonomischem Wert beobachtet. In Tabelle 4.2 sind die summarischen Gehalte der Carbonsäureklassen in je einem als Beispiel ausgewählten Angehörigen einer Gattung aufgeführt.

#### 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

**Tabelle 4.2** Gesamtgehalte verschiedener Carbonsäureklassen (in Gew.-%) in ausgewählten SAB-Verbindungen, die nicht identifiziert wurden oder mit weniger als 0,05 Gew.-% am FAME-Inventar vertreten sind, wurden quantitativ nicht erfasst.

Spezies	Probenbezeichnung	<i>n</i> -SCFA (*)	mono- -SCFA	dien- SCFA	iso- SCFA	anteiso- SCFA	OH- SCFA
<b>Sphingomonadales</b>							
<i>Sphingomonas</i> sp.	Hal CSA 62ad	8,8	76,3	-	-	-	14,4
<i>Erythrobacter longus</i>	Hal CSA 60	21,7	65,8	-	-	-	11,6
<b>Rhodobacterales</b>							
<i>Rhodobacter veldkampii</i>	ORS BMM 3	22,4	73,7	-	-	-	0,5
<i>Roseobacter algicola</i>	Hal MBA 18	9,4	83,4	6,1	-	-	0,6
<b>Pseudomonadales</b>							
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	OR CDC 2	25,1	67,7	-	1,4	1,3	1,5
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PS CSA 2	29,2	66,1	-	3,3	0,6	-
<b>Alteromonadales</b>							
<i>Alteromonas macleodii</i>	Geo MBA 3/7.1	38,0	52,5	-	1,3	6,7	0,3
<i>Colwellia</i> sp.	Hal MBA 11b	46,3	49,9	-	2,1	0,3	0,1
<i>Marinobacter</i> sp.	Geo MBA 1/1.1	37,9	55,7	-	0,7	0,1	3,5
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	Geo MBA 2/5.3.1	33,6	62,5	-	2,9	0,1	0,7
<i>Pseudoalteromonas carrageeno.</i>	Hal MBA 9b1	40,9	54,9	-	1,6	1,3	1,0
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Ph MBA 142d	21,5	64,1	-	1,8	0,4	1,9
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	Geo MBA 4/8.1	31,4	65,6	-	2,4	-	0,3
<b>Vibrionales</b>							
<i>Vibrio splendidus</i>	Geo MBA 3/22.2.1	39,5	54,3	0,6	2,8	0,8	0,1
<b>Bacillales</b>							
<i>Bacillus</i> sp.	P MBA 215	2,1	-	-	64,4	17,1	-

\*) = Gehalte *n*-Carbonsäuren inklusive ‚summed in feature‘ (s. Kapitel 4.2.1 und 4.2.5)

Im Folgenden wird das Vorkommen der Substanzklassen in den jeweiligen Bakterientaxa sowie repräsentativer Isolate dargestellt und diskutiert.

#### 4.2.1 Gesättigte *n*-Fettsäuren

Gesättigte *n*-FA in unterschiedlichen Anteilen sind in den untersuchten Bakterien ubiquitär auftretende Verbindungen. In den  $\alpha$ -Proteobakterien ist diese Verbindungsklasse mit C<sub>12</sub>- bis C<sub>18</sub>-Verbindungen vertreten und wird von der Hexadecansäure (*n*-C<sub>16:0</sub>) dominiert. In den  $\gamma$ -Proteobakterien wurden generell vergleichsweise höhere Gehalte gesättigter C<sub>10</sub>- bis C<sub>18</sub>-*n*-Carbonsäuren, von denen ebenfalls die *n*-C<sub>16:0</sub> am stärksten vertreten ist, aufgefunden. Aufgrund einer für mehrere  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien beobachteten partiellen GC-Koelution der *n*-C<sub>18:0</sub> und der 11-Methyloctadec-11-ensäure (s. Kapitel 4.2.5), kann der Anteil dieser Substanzklasse lediglich auf etwa 10 bis 20 Gew.-% in den  $\alpha$ -Proteobakterien geschätzt werden. In den  $\gamma$ -Proteobakterien wurden Gehalte der *n*-Carbonsäuren zwischen 14,7 und 45,1 Gew.-% bestimmt. Die Umsetzung ungesättigter Komponenten mit H<sub>2</sub>, die in diesen Fällen zu einer chromatographischen Trennung der oben genannten Verbindungen geführt und somit eine Quantifizierung ermöglicht hätte, konnte nur für ausgewählte Proben durchgeführt werden.

In *Bacillus* sp. wurden lediglich C<sub>14</sub>- bis C<sub>16</sub>-*n*-FA in relativ geringen Konzentrationen beobachtet.

### 4.2.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren

Einfach ungesättigte FA sind aus vielen Gram-negativen Bakterientaxa bekannt. In den untersuchten Proteobakterien wurden monoen-Carbonsäuren mit 12 bis 19 C-Atomen als dominante Komponenten der Fraktion anhand ihrer typischen MS-Fragmentierung beobachtet. In dem Vertreter der Bacillales wurden diese Verbindungen dagegen nicht gefunden.

Zur Kennzeichnung der Doppelbindungsposition  $\Delta$  von monoen-SCFA wurden diese für ausgewählte Isolate in ihre Dimethyldisulfid(DMDS)-Addukte überführt. In allen  $\alpha$ -Proteobakterien, in denen diese Verbindungsklasse auf Komponenten mit 16 bis 18 C-Atomen begrenzt zu sein scheint, ist die *n*-Octadec-11-ensäure (*n*-C<sub>18:1</sub> $\Delta^{11}$ ) die deutlich hervortretende Hauptkomponente. Während in den Vertretern der Sphingomonadales Gehalte der *n*-C<sub>18:1</sub> zwischen 49,9 und 59,9 Gew.-% gemessen wurden, ist diese in den Rhodobacterales mit 73,7 bis 83,9 Gew.-% höher konzentriert. Auffallend ist ferner für die Gattung *Rhodobacter*, dass die enthaltene *n*-C<sub>18:1</sub> die einzige monoen-FA ist.

Wesentlich komplexere Verteilungsmuster, in denen verschiedene monoen-Carbonsäuren dominierend auftreten können, wurden in den  $\gamma$ -Proteobakterien beobachtet. Während in den Gattungen der Alteromonadales und der Vibrionales die Strukturisomere der *n*-Hexadecensäure (C<sub>16:1</sub> $\Delta^7$ ,  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{11}$ ) mit Anteilen von bis zu 48,2 Gew.-% quantitativ am stärksten vertreten sind, besitzen die Angehörigen der Pseudomonadales die *n*-C<sub>18:1</sub> $\Delta^{11}$  als Hauptkomponente. In einem unbestimmten  $\gamma$ -Proteobakterium (Hal MBA 40<sub>b0</sub>) sind Isomere der Heptadecensäure (*n*-C<sub>17:1</sub> $\Delta^9$ ,  $\Delta^{11}$ ) die dominierenden Komponenten dieser Fraktion.

Wie Abb. 4.2 zeigt, ist das quantitative Verhältnis *n*-C<sub>18:1</sub>/*n*-C<sub>16:1</sub> für die Isolate der Proteobakterien von chemotaxonomischer Relevanz.

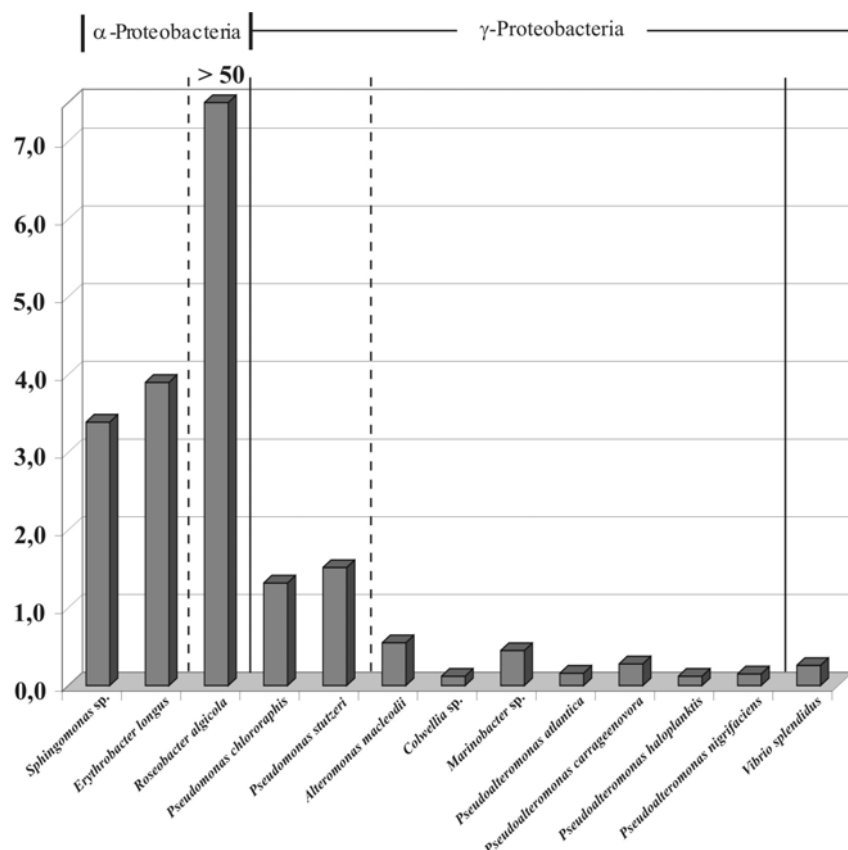


Abbildung 4.2 *n*-C<sub>18:1</sub>/*n*-C<sub>16:1</sub>-Verhältnisse (Gew.-%) in ausgewählten Proteobakterien-Isolaten.

#### 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

So unterscheiden sich die  $n\text{-C}_{18:1}/n\text{-C}_{16:1}$ -Verhältnisse in den  $\alpha$ - und den  $\gamma$ -Proteobakterien deutlich. Während in allen  $\alpha$ -Proteobakterien allgemein Werte  $> 2,9$  beobachtet wurden, liegen in den  $\gamma$ -Proteobakterien durchgängig  $n\text{-C}_{18:1}/n\text{-C}_{16:1}$ -Verhältnisse  $< 2,8$  vor. In beiden Proteobacteria-Klassen wurden für einzelne Familien, wie zum Beispiel für die Sphingomonadaceae oder die Pseudomonadaceae, typische Werte festgestellt. Signifikante Unterschiede treten auch zwischen den Gattungen der Alteromonadaceae auf. So wurde für *Marinobacter* sp. ein mittlerer Wert von 0,56 ( $n = 3$ ) bestimmt. Im Gegensatz dazu wurden im arithmetischen Mittel für vier *Pseudoalteromonas*-Spezies (*P. atlantica*, *P. carrageenovora*, *P. haloplanktis*, *P. nigrifaciens*) typische  $n\text{-C}_{18:1}/n\text{-C}_{16:1}$ -Verhältnisse um 0,15 gemessen.

Neben der Position der Doppelbindungen ist die allgemeine Verteilung einfach ungesättigter FA in einem Bakterium hinweisgebend auf die genutzten Biosynthesepfade. Eine Übersicht über die Zusammensetzung einfach ungesättigter FA im Zellmaterial verschiedener Bakterien gibt Tabelle 4.3.

**Tabelle 4.3** Gehalte der mono-en-SCFA und Position ihrer Doppelbindungen  $\Delta$  in  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien.

	$\alpha$ -Proteobakt.		$\gamma$ -Proteobakterien							
	<i>Erythrobacter longus</i> PS CSA 6		<i>Pseudomonas stutzeri</i> PS CSA 7		<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> Geo MBA 2/5.3.1		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> Geo MBA 4/6.1		<i>Vibrio splendidus</i> Geo MBA 3/22.2.1	
	$\Delta$	$[\mu\text{g mg}^{-1}]$	$\Delta$	$[\mu\text{g mg}^{-1}]$	$\Delta$	$[\mu\text{g mg}^{-1}]$	$\Delta$	$[\mu\text{g mg}^{-1}]$	$\Delta$	$[\mu\text{g mg}^{-1}]$
$n\text{-C}_{12:1}$	–	–	–	–	<u>5</u>	tr.	–	–	–	–
$n\text{-C}_{13:1}$	–	–	–	–	<u>5</u>	tr.	<u>5</u>	$< 0,1$	–	–
$n\text{-C}_{14:1}$	–	–	–	–	<u>7</u>	$< 0,1$	<u>7</u>	0,1	–	–
$n\text{-C}_{15:1}$	–	–	–	–	7,9	0,2	–	–	–	–
$n\text{-C}_{16:1}$	9	n.b.	9	n.b.	<u>7,2</u> , 11	10,2	<u>7,2</u>	7,3	9	n.b.
$n\text{-C}_{17:1}$	11	n.b.	<u>9</u> , 11	n.b.	9, 11	1,9	<u>9</u> , 11	0,2	–	–
$n\text{-C}_{18:1}$	11	n.b.	11	n.b.	<u>9</u> , <u>11</u>	1,6	<u>11</u>	1,7	11	n.b.
$n\text{-C}_{19:1}$	–	–	–	–	<u>11</u>	$< 0,1$	–	–	–	–

Gehalte (in Bezug auf gefriergetrocknetes Zellmaterial) wurden mit Hilfe eines Internen Standards (IS =  $n\text{-C}_{21:0}$ ) für die unbehandelte FAME-Fraktion errechnet. Die Bestimmung der  $\Delta$ -Positionen erfolgte an den DMDS-Addukten. Unterstrichene  $\Delta$ -Werte geben Komponenten höchster Konzentration im Isomergemisch an. Die relative Verteilung der Strukturisomere wurden anhand der Peakflächen diagnostischer Ionenspuren eingeordnet. – = nicht nachgewiesen, n.b. = nicht bestimmt, tr. = in Spurenkonzentration ( $\leq 0,05$  Gew.-%).

Während in den  $\gamma$ -Proteobakterien häufig mono-en-SCFA mit 12 bis 19 C-Atomen beobachtet wurden, ist in den  $\alpha$ -Proteobakterien diese Substanzklasse auf die  $\text{C}_{16}$ - bis  $\text{C}_{18}$ -Komponenten beschränkt. Wie Tabelle 4.3 zeigt, sind Doppelbindungen in den Proteobacteria-Spezies mit zunehmender Kettenlänge weiter vom Ende der funktionellen Gruppe entfernt positioniert. Bis zu drei Strukturisomere einer Verbindung wurden in den *Pseudoalteromonas*-Spezies gefunden. Interessant ist darüber hinaus, dass bei jeweiligen Kettenlängen spezifische Isomere verhältnismäßig hervortreten ( $n\text{-C}_{12:1}\Delta^5$ ,  $n\text{-C}_{14:1}\Delta^7$ ,  $n\text{-C}_{16:1}\Delta^9$ ,  $n\text{-C}_{18:1}\Delta^{11}$ ). Die Resultate legen die Vermutung nahe, dass bei der FA-Synthese schwammassoziierten Bakterien C-Einheiten vom Ende der funktionellen Gruppe eingesetzt werden.

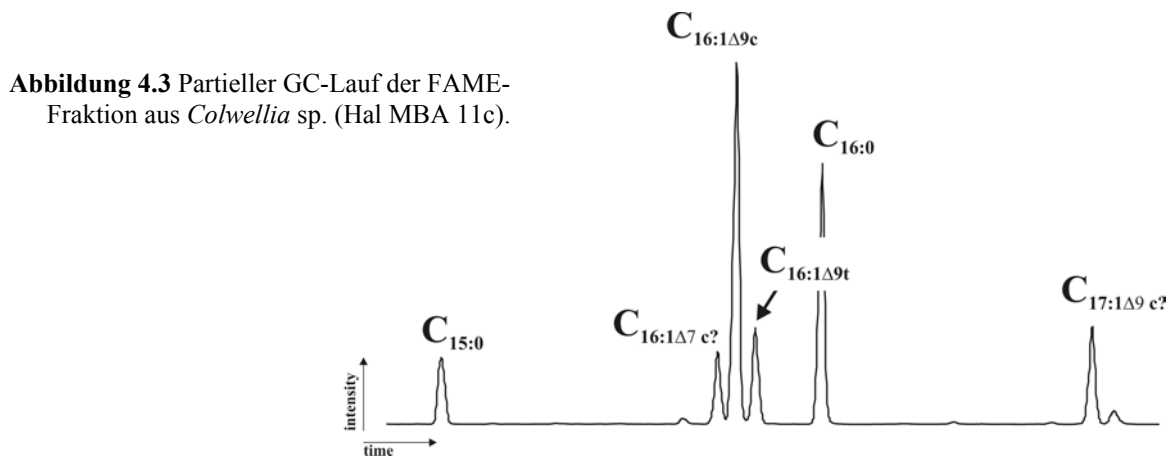


cis-trans-Isomerie

In mikrobiologischen Studien hat sich gezeigt, dass die bakterielle Sekundärstoffproduktion durch die Einstellung von vom physiologischen Optimum abweichenden Kulturbedingungen stimuliert werden kann. Abhängig von der Art und dem Ausmaß einer physiologischen Beanspruchung wird darüber hinaus oftmals mit einer Modifikation der Membranzusammensetzung reagiert. Die Bewertung des physiologischen Belastungsgrads anhand charakteristischer FA ist daher allgemein von pharmakologischem Interesse.

Die bakterielle *de-novo*-Synthese von mono-SCFA führt – festgelegt durch die genutzten Biosynthesewege – zur bevorzugten Produktion von Komponenten mit *cis*-Konfiguration (GUCKERT *et al.*, 1987; KEWELOH und HEIPIEPER, 1996). Die *cis*-mono-SCFA sind demgemäß gegenüber ihren Homologen mit *trans*-Konfiguration deutlich hervortretend, und es wurden für Bakterienlipide in Sedimenten und in einigen Isolaten der  $\gamma$ -Proteobakterien übliche *trans/cis*-Konzentrationsverhältnisse von etwa 0,1 festgestellt (VOLKMAN und JOHNS, 1977; PERRY *et al.*, 1979; WHITE *et al.*, 1979a; VOLKMAN *et al.*, 1980; GILLAN und HOGG, 1984; GUCKERT *et al.*, 1985). Relativ erhöhte Werte des *trans/cis*-Verhältnisses wurden in vielen Laborstudien als Reaktion auf physiologisch belastende Kulturbedingungen („environmental stress“), wie z.B. Zusammensetzung des Kulturmediums, pH, T, Anwesenheit zelltoxischer Substanzen, festgestellt (GUCKERT *et al.*, 1986; OKUYAMA *et al.*, 1991; HEIPIEPER *et al.*, 1992; KIEFT *et al.*, 1994; WEBER *et al.*, 1994). Zur Modifizierung der Membraneigenschaften werden dabei *cis*-ungesättigte Carbonsäuren durch Transisomerisierung in ihre *trans*-ungesättigten Isomere überführt (DIEFENBACH und KEWELOH, 1994; VON WALLBRUNN *et al.*, 2003). Infolge der verschiedenen sterischen Strukturen der jeweiligen mono-SCFA führt die *cis-trans*-Konversion zu einer Verringerung der Membranfluidität (KEWELOH und HEIPIEPER, 1996).

Wie Koelutionsexperimente der SCFA-Fractionen mit käuflichen Standards (SIGMA®) sowie die MS-Fragmentierung der DMDS-Addukte zeigten, lagen für verschiedene Bakterien beide Stereoisomere verschiedener mono-SCFA in typischen Proportionen (*trans/cis*  $\approx$  0,1) vor. Für vereinzelte der untersuchten Bakterien, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, ließen sich dagegen signifikant erhöhte Gehalte der *trans*-Hexadec-9-ensäure in Bezug zu der *cis*-Hexadec-9-ensäure feststellen. In Abb. 4.3 ist ein Ausschnitt des GC-Messlaufs der FA-Fraktion eines *Colwellia*-sp.-Stammes, exemplarisch für ein solches Isomerenprofil dargestellt.



#### 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

Ähnliche Verteilungsmuster der  $C_{16:1}$ -Isomere wurden für alle untersuchten *Colwellia*-sp.-Isolate festgestellt. Die FA-Fraktion aus *Colwellia* sp. wird von der  $C_{16:1}\Delta^{9c}$  dominiert. Ferner sind neben der  $n-C_{16:0}$  und der  $C_{17:1}\Delta^9$  signifikante Anteile der  $C_{16:1}\Delta^{9t}$  erkennbar. Die relative Quantifizierung der Isomere der Hexadec-9-ensäuren erbrachte für dieses Bakterienkultivat ein *trans/cis*-Verhältnis von 0,27, das über den Literaturangaben für verschiedene  $\gamma$ -Proteobakterien liegt.

Es ist daher zu vermuten, dass sich die angesetzten Bedingungen belastend auf die Physiologie von *Colwellia* sp. auswirkten und daher die Konversion einfach ungesättigter FA stimuliert haben. Die Frage, ob die Synthese vergleichsweise hoher Gehalte der *trans*-Stereoisomere von einer Produktion von Sekundärmetaboliten in *Colwellia* sp. begleitet wurde, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt.

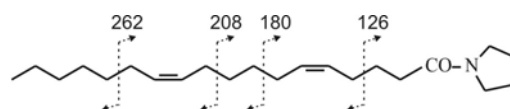
#### 4.2.3 Zweifach ungesättigte Fettsäuren

Zweifach ungesättigte FA scheinen generell selten in Bakterien aufzutreten und sind von verschiedenen Gram-negativen und -positiven Taxa in meist geringen Anteilen beschrieben worden (WILKINSON, 1988; VAINSHTEIN *et al.*, 1992; NICHOLS *et al.*, 1994; CAVIGELLI *et al.*, 1995; ZELLES, 1997; CARBALLEIRA *et al.*, 2000; CARBALLEIRA *et al.*, 2001; KOBLÍŽEK *et al.*, 2003).

In dem Probenmaterial tritt diese Verbindungsklasse vereinzelt in den Proteobakterien mit der Octadecadiensäure ( $n-C_{18:2}$ ) auf, wobei höchste Relativgehalte mit 15,8 Gew.-% in einem unbestimmten  $\alpha$ -Proteobakterium (Hal MBA 17b) gemessen wurden. In dem Firmicutes-Vertreter sind dien-Carbonsäuren abwesend.

Die Eigenschaften der dien-Carbonsäuren führen zu typischen GC-Retentionszeiten und Massenspektren. Die MS-Fragmentierung des Pyrrolidids der  $n-C_{18:2}$  ( $M^+ = 333$  amu) in dem  $\alpha$ -Proteobakterium (Hal MBA 17b) ergab deutliche Fragmentationen ( $m/z$  126/127, 140, ..., 208, 222, 234, 248, 262, ...), die zur vorläufigen Identifizierung der Komponenten als Octadeca-5,11-diensäure ( $C_{18:2}\Delta^{5,11}$ ) führen (Abb. 4.4).

Den methodischen Untersuchungen von VINCENTI *et al.* (1987) zu Folge ist das DMDS-Addukt dieser Komponente mit vier Thiomethylgruppen substituiert ( $M^+ = 482$ ). Das Fehlen des DMDS-Derivats der Octadeca-5,11-diensäure in der behandelten Carbonsäurefraktion ist möglicherweise auf eine vergleichsweise hohe Polarität des Moleküls, die dessen GC-Elution verhindert, zurückzuführen.



**Abbildung 4.4** MS-Fragmentierungsschema des *N*-Octadeca-5,11-dienoylpyrrolidins aus Hal MBA 17b ( $\alpha$ -Proteobakterium).

#### 4.2.4 Terminal methylverzweigte Fettsäuren

Terminal – also *iso*( $i$ ,  $\omega 2$ )- und *anteiso*( $ai$ ,  $\omega 3$ )- – monomethylverzweigte SCFA sind typische Membranlipidbestandteile Gram-positiver Bakterien (O'LEARY und WILKINSON, 1988). Mit geringen Anteilen sind diese Komponenten aber auch in Gram-negativen Bakterien, wie z.B. den Sulfat reduzierenden  $\delta$ -Proteobakterien *Desulfobacter* und *Desulfovibrio*, vertreten (DOWLING *et al.*, 1988; KANEDA, 1991).

Die Verbindungen zeigen die für gesättigte Carbonsäuren typische MS-Fragmentierung. Als diagnostische Fragmente treten  $M^+ -43$  (*i*) und  $M^+ -57$  (*ai*), die aus der bevorzugten Abspaltung von  $CH_3-C_2H_4$ - bzw.  $CH_3-C_3H_6$ -Gruppen resultieren, hervor. In allen untersuchten  $\gamma$ -Proteobakterien wurden *i*- und *ai*-FA in geringen Konzentrationen (max. 8,7 Gew.-% in *Alteromonas macleodii*) mit 13 bis 18 C-Atomen beobachtet. In den  $\alpha$ -Proteobakterien sind sie dagegen generell nicht vertreten.

Vergleichsweise hohe Gehalte an *i*- (64,4 Gew.-%) und *ai*- (17,1 Gew.-%) FA kennzeichnen das Lipidinventar von *Bacillus* sp.. Hier ist die Substanzklasse mit  $C_{14}$ - bis  $C_{17}$ -Komponenten vertreten und *i*- $C_{14:0}$  die Hauptkomponente der Fraktion. Des Weiteren wurden in diesem Bakterium drei an  $\Delta^5$  ungesättigte  $C_{16}$ - bzw.  $C_{17}$ -FA festgestellt, für die aufgrund relativ geringer ECL-Werte eine Methylverzweigung vermutet werden kann. Da Referenzkomponenten nicht zur Verfügung standen, konnten die Positionen von Methylverzweigungen – terminal oder mittkettig – für diese Komponenten nicht geklärt werden.

#### 4.2.5 Mittkettig methylverzweigte Fettsäuren

FA mit mittkettiger Methylverzweigung (mcb-FA) werden anhand ihrer relativen GC-Retentionszeit mit einem für FA typischen Spektrum identifiziert. In dem Probenmaterial wurde gesättigte mcb-SCFA in der Ordnung Alteromonadales gefunden. Basierend auf dem intensiven Auftreten diagnostischer Fragmente ( $m/z$  167, 171/172/173, 199) wurde die in den Gattungen *Marinobacter* und *Pseudoalteromonas* in relativ geringen Konzentrationen beobachtete mcb-SCFA als 10-Me-Hexadecansäure (10-Methylpalmitinsäure) bestimmt (Abb. 4.5).

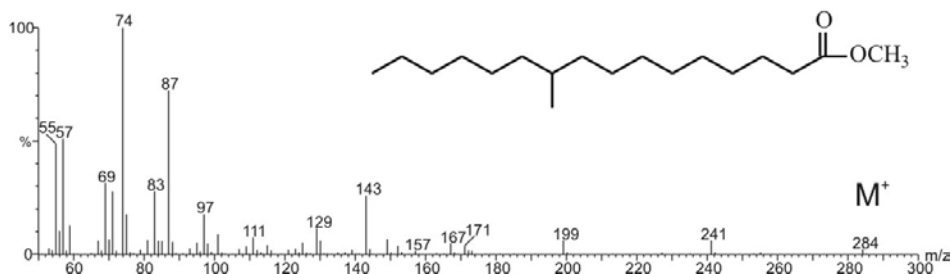
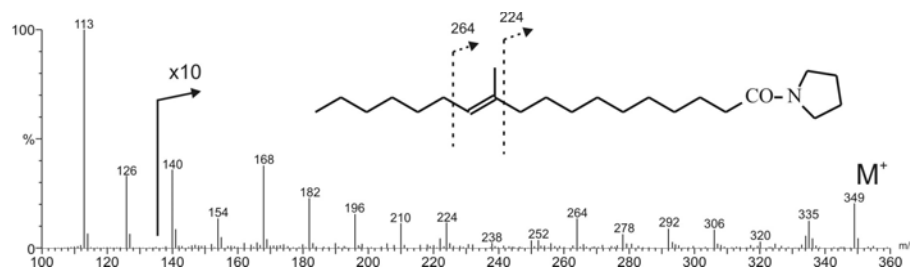


Abbildung 4.5 Massenspektrum ( $EI^+$ ) des 10-MethylhexadecansäureME .

In allen  $\alpha$ - und in wenigen  $\gamma$ -Proteobakterien wurden weiterhin mit einer mcb- $C_{19:1}$ -FA ( $M^+ = 310$  als ME) ungesättigte mcb-SCFA beobachtet. Da diese mit der *n*- $C_{18:0}$  koeluierten (ECL = 18,04), wurden diese Verbindungen bei der quantitativen Analyse gemeinsam betrachtet („summed in feature“). Die relative Retentionszeit und die MS-Fragmentierung dieser Komponente deuten an, dass es sich nicht um die in Gram-negativen Bakterien häufig auftretenden *n*-mono- oder Cyclopropylcarbonsäuren handelt. Die GC-Analyse hydrierter Fraktionen aus Hal MBA 17b ( $\alpha$ -Proteobakterium sp.), PS CSA 6 (*Erythrobacter longus*) und Hal MBA 18 (*Roseobacter algicola*) ergab für das umgesetzte Homolog einen für mittkettig methylverzweigte FAME charakteristischen ECL-Wert von 18,40 (s. Kapitel 5.1.5). Bei der MS-Analyse der gesättigten Komponente ( $M^+ = 312$ ) wurden ferner bevorzugte Fragmentierungen bei  $m/z$  213, 185/186, 181, die eine Verzweigung an C-11 indizieren, festgestellt (RYHAGE und STENHAGEN, 1960; THIEL *et al.*, 1999a). Die MS-Fragmentierung des Pyrrolidids der  $C_{19:1}$ -Komponente (Abb. 4.6) zeigt gute Übereinstimmung zu der

#### 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

des Pyrrolidin-Derivats einer 11-Methyloctadec-11-ensäure (11-Methylvaccensäure), die zuvor im  $\alpha$ -Proteobakterium *Rhizobium* sp. beobachtet wurde (GERSON *et al.*, 1974). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass diese Verbindung auch in den analysierten Bakterien auftritt.

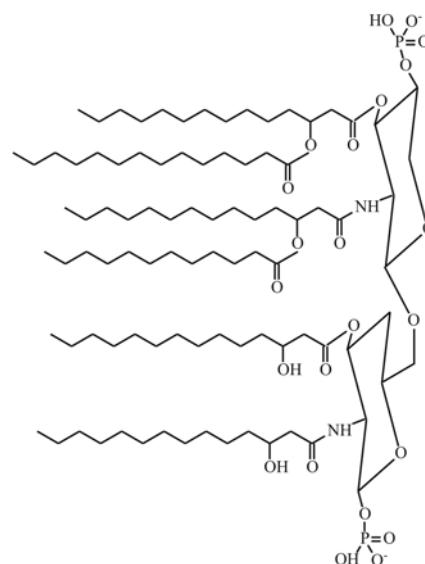


**Abbildung 4.6** MS-Fragmentierung ( $EI^+$ ) des Pyrrolidin-Derivats der 11-Methyloctadec-11-ensäureME aus *Erythrobacter longus* (PS CSA 6); vgl. GERSON *et al.* (1974).

Die FAME-Fraktion von *Erythrobacter longus* wurde ebenfalls mit DMDS zur Lokalisierung von  $\Delta$ -Positionen behandelt. Neben hohen Gehalten des 11-Methyloctadec-11-ensäureME wurden geringe Konzentrationen des DMDS-Addukts dieser Verbindung sowie eine vollständige Umsetzung linearer monoen-Carbonsäuren festgestellt. Es ist daher zu schlussfolgern, dass die Transformation mittkettig methylverzweigter monoen-Carbonsäuren mit DMDS im Vergleich zu *n*-monoen-Carbonsäuren deutlich erschwert ist. Demzufolge scheint dieses Verfahren zur Aufklärung der  $\Delta$ -Position für Komponenten der hier beschriebenen Struktur nicht geeignet zu sein.

#### 4.2.6 Hydroxyfettsäuren

Hydroxyfettsäuren, die an C-2 ( $\alpha$ -Position) oder C-3 ( $\beta$ -Position) substituiert sind, wurden als Lipidkomponenten von einigen Gram-positiven und zahlreichen Gram-negativen Bakterien beschrieben (IKEMOTO *et al.*, 1980; EDLUND *et al.*, 1985; URDACI *et al.*, 1990; WELCH, 1991; ZELLES, 1997). In Letzteren bilden Hydroxycarbonsäuren beispielsweise Teilstrukturen des ‚Lipid A‘ (Abb. 4.7), das in den der äußeren Zellwand aufgelagerten Lipopolysacchariden eingebunden ist (z.B. KRAUSS *et al.*, 1989; MADIGAN *et al.*, 1997). Ester- und Amidbindungen, über die Hydroxycarbonsäuren an den Lipopolysaccharidrest gekoppelt sind, wurden bei der Aufbereitung des Zellmaterials mit TMCS hydrolysiert.

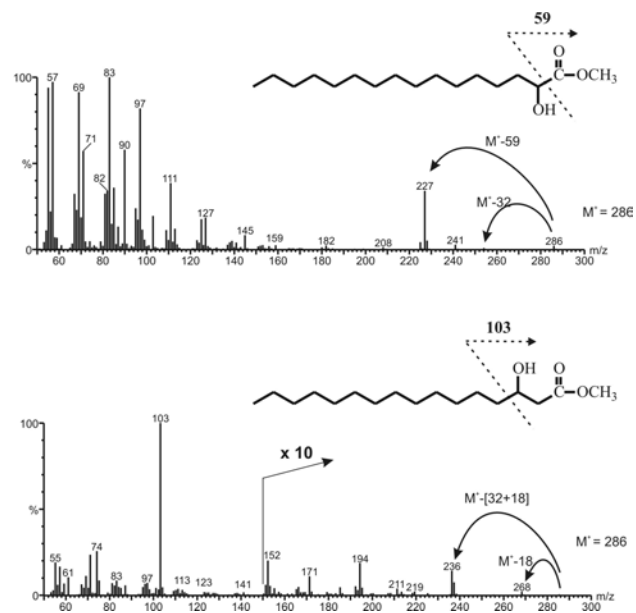


**Abbildung 4.7** Strukturformel der FA-umfassenden Teilstruktur des ‚Lipid A‘ aus  $\gamma$ -Proteobakterien.

Anhand ihrer typischen relativen Retentionszeiten und Massenfragmentierungen wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ -OH-SCFA in den untersuchten Bakterien festgestellt. Diagnostische Fragmente sind für die an C-2 hydroxylierten Verbindungen  $M^+ -59$  ( $\text{CH}_3\text{-CO}_2$ ) und  $m/z$  90 ( $\text{CH}_3\text{-CO}_2\text{-OH-CH}$ ; McLafferty-Ion nach Spaltung zwischen C-2 und C-3) und für die  $\beta$ -OH-Carbonsäuren  $m/z$  103 ( $\text{CH}_3\text{-CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH-OH}$ ). In Abb. 4.8 sind exemplarisch die Massenspektren der  $\alpha$ -OH-Hexadecansäure und der  $\beta$ -OH-Hexadecansäure (als ME) gezeigt.

In den analysierten Bakterien sind Hydroxycarbonsäuren auf die Proteobacteria, in denen sie trotz ihres unregelmäßigen Auftretens zur chemotaxonomischen Charakterisierung herangezogen werden können, beschränkt.  $\alpha$ -OH-Carbonsäuren kommen ausnahmslos in vielen  $\alpha$ -Proteobakterien mit 14, 15 oder 16 C-Atomen mit insgesamt bis zu 14,4 Gew.-% (*Sphingomonas* sp.) vor. Auffallend ist die Bevorzugung der geradzahligten Homologe gegenüber der  $\alpha$ -OH- $\text{C}_{15:0}$ .

Im überwiegenden Teil der  $\gamma$ -Proteobakterien wurden dagegen  $\beta$ -OH-Carbonsäuren der C-Anzahl 10, 11 oder 12 in vergleichsweise geringeren Konzentrationen gemessen. Wie das Auftreten der  $\beta$ -OH- $\text{C}_{10:0}$  in *Roseobacter algicola* zeigt, sind an C-3 hydroxylierte Carbonsäuren aber nicht auf die  $\gamma$ -Klasse der Proteobacteria begrenzt.



**Abbildung 4.8** Massenspektren ( $\text{EI}^+$ ) des 2-OH-HexadecansäureME und des 3-OH-HexadecansäureME.

#### 4.2.7 Hopanoide

Hopanoide sind pentacyclische Triterpenoide die als Membranlipidbestandteile in vielen Bakterien auftreten und denen das Grundgerüst des  $17\beta(\text{H}),21\beta(\text{H})$ -Hopans gemein ist (s. Kapitel 5.4). Hopanoide wurden sowohl in zahlreichen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien als auch in den Bacillaceae aufgefunden (OURISSON *et al.*, 1979; KANNENBERG *et al.*, 1980; ROHMER *et al.*, 1984; TAYLOR, 1984).

In den untersuchten Gesamtzellhydrolysaten von Bakterienisolaten wurden die aus dem als Referenzorganismus eingesetzten *Gluconacetobacter xylinus* bekannten freien Hopanoide – wie Hop-17(21)-en (hier 2,0 Gew.-% der Gesamtfraction) und Neohop-13(18)-en (0,1 Gew.-%) – sowie weitere vergleichsweise gering funktionalisierte Komponenten hopanoider Struktur nicht beobachtet. Für eine Degradation polyfunktionalisierter Hopanoide, wie z.B. der von vielen Bakterien bekannten Bakteriohopanpolyole, stand das Zellmaterial nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

### 4.3 Diskussion

Die Ergebnisse der lipidchemischen Untersuchungen an 46 aus Poriferen isolierten Bakterienkulturen zeigen, dass von den verschiedenen Taxa umfangreiche Carbonsäureinventare in typischen qualitativen and quantitativen Verteilungen synthetisiert werden. Für die chemotaxonomische Klassifizierung von Bakterien sind neben der C-Anzahl die strukturellen Ausprägungen der Carbonsäuren von Bedeutung. Wie am Beispiel der  $n\text{-C}_{18:1}/n\text{-C}_{16:1}$ -Verhältnisse gezeigt wurde, können basierend auf dem Carbonsäureprofil im Gesamtzellhydrolysat diverse aussagekräftige Kriterien zur chemotaxonomischen Charakterisierung ausgearbeitet werden, die die Differenzierung verschiedener Bakterien mindestens bis auf Gattungsebene ermöglichen.

Es wurden in den Bakterienkulturen überwiegend Carbonsäuren mit 12 bis 19 C-Atomen festgestellt, was den üblichen Verteilungen in Bakterien entspricht. Ausnahmen finden sich unter den Alteromonadales, in denen mit der  $n\text{-C}_{10:0}$  und  $n\text{-C}_{11:0}$  sehr kurzkettige Verbindungen aufgefunden wurden.

Die untersuchten Gram-negativen SAB synthetisieren hohe Gehalte an gesättigten und einfach ungesättigten  $n$ -Carbonsäuren, von denen die geradzahigen Homologe quantitativ hervortreten. *I*- und *ai*-methylverzweigte Carbonsäuren sind in diesen Bakterien – wenn vorhanden – nur in geringen Konzentrationen vertreten. Im Vergleich dazu wurden in dem Gram-positiven schwammassoziierten *Bacillus* sp. neben geringen Gehalten geradkettiger gesättigter Carbonsäuren hohe Anteile terminal verzweigter Carbonsäuren festgestellt. Diese allgemeinen Befunde stehen in guter Übereinstimmung zu den FA-Profilen in nicht mit Schwämmen assoziierten Bakterien gleicher phylogenetischer Gruppen (O'LEARY und WILKINSON, 1988; WILKINSON, 1988; WELCH, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1996).

Die Präsenz einzelner Strukturisomere gibt Auskunft über die genutzten Biosynthesewege und kann indirekt als Hinweis auf die metabolischen Fertigkeiten der Produzenten herangezogen werden. So fällt bei einem Vergleich der Gram-negativen Gruppen auf, dass kurzkettige monoeno-Carbonsäuren ( $n\text{-C}_{12:1}$  bis  $n\text{-C}_{15:1}$ ), die neben ihren höhermolekularen Homologen ( $n\text{-C}_{16:1}$  bis  $n\text{-C}_{19:1}$ ) in den  $\gamma$ -Proteobakterien vertreten sind, in den  $\alpha$ -Proteobakterien fehlen. Ferner wird in den  $\gamma$ -Proteobakterien eine deutlich höhere Anzahl individueller Isomere der monoeno-Carbonsäuren als in der  $\alpha$ -Klasse vorgefunden.

Bekannt ist, dass in der Bakteriendomäne zwei verschiedene Arten der Carbonsäuresynthese vertreten sind, bei denen mittels spezifischer Desaturasen Doppelbindungen in die (Phospholipid-)Acylreste eingeführt werden. Im Zuge des häufig von Bakterien genutzten ‚anaeroben Biosynthesewegs‘ werden Doppelbindungen in einem Zwischenschritt der Carbonsäuresynthese eingesetzt. Typische Produkte dieses Synthesemechanismus sind  $n\text{-C}_{16:1}\Delta^9$  und  $n\text{-C}_{18:1}\Delta^{11}$  (BLOCH *et al.*, 1961; KASS und BLOCH, 1967). In wenigen Fällen wurde ebenso die Produktion von  $n\text{-C}_{16:1}\Delta^7$  und  $n\text{-C}_{18:1}\Delta^9$  als Folge dieses Synthesepfads beobachtet (SCHEUERBRANDT *et al.*, 1961). Wenige Bakterien nutzen den sog. ‚aeroben Biosyntheseweg‘, bei dem gesättigte FA im Anschluss an ihre Bildung untersättigt werden. Als Folge dieses Mechanismus können individuelle Komponenten oder Isomerengemische mit Untersättigungen an  $\Delta^8$ -,  $\Delta^9$ - und  $\Delta^{10}$  entstehen (FULCO *et al.*, 1964; FULCO, 1969; KEWELOH und HEIPIEPER, 1996). Die Beobachtung der  $n\text{-C}_{16:1}\Delta^9$  und  $n\text{-C}_{18:1}\Delta^{11}$  in den untersuchten  $\alpha$ - und den  $\gamma$ -Proteobakterien lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass beide Klassen

auf den anaeroben Biosynthesepfad zurückgreifen. Ob das Fehlen von monoen-SCFA in den  $\alpha$ -Proteobakterien auf die Art der Biosynthese oder allein auf die quantitative Dominanz anderer Komponenten zurückzuführen ist, konnte nicht ermittelt werden.

Interessant ist darüber hinaus das Auftreten gesättigter mittkettig methylverzweigter Carbonsäuren in Form der 10-Me-C<sub>16:0</sub> in mehreren Arten der Alteromonadales. Im Allgemeinen gilt die Substanzklasse der mcb-Carbonsäuren als hervorragende Biomarkerklasse für Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien bzw. diverse Gruppen der Actinobakterien (s. Kapitel 5). In den Pseudoalteromonadales ist diese Substanzklasse dagegen noch nicht beobachtet worden, so dass hier ein neuer Membranlipidbestandteil dieses Bakterientaxons entdeckt wurde.

Die Befähigung zur Synthese methylverzweigter monoen-SCFA ist für einige phylogentisch diverse Bakterien bekannt, und bringt oftmals terminal verzweigte monoen-FA hervor. So ist z.B. die *i*-C<sub>17:1</sub> $\Delta^9$  charakteristischer Membranlipidbestandteil diverser Sulfat reduzierender  $\delta$ -Proteobakterien wie *Desulfovibrio desulfuricans* (BOON *et al.*, 1977; TAYLOR und PARKES, 1983). Mittkettig methylverzweigte monoen-SCFA scheinen dagegen unter den Bakterien begrenzt verbreitet zu sein. Für Angehörige des Gram-positiven *Corynebacterium* wiesen NIEPEL *et al.* (1998) eine 9-Methyloctadec-10-ensäure nach. Verschiedene Strukturisomere mittkettig methylverzweigter monoen-SCFA, wie auch die beobachtete 11-Methyloctadec-11-ensäure, sind dagegen aus Gram-negativen Bakterien dokumentiert. Zu den Produzenten zählen hier phylogenetisch verteilte Vertreter der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien (GERSON *et al.*, 1974; GUCKERT *et al.*, 1986; BARNES *et al.*, 1989; MOSS *et al.*, 1990; ABRAHAM *et al.*, 1997; ROWE *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass auch Spezies der Alteromonadales zum Aufbau mittkettig methylverzweigter monoen-SCFA befähigt sind.

Als ungewöhnlich ist das Auftreten nicht spezifizierter Octadecadiensäuren in Angehörigen der  $\alpha$ -Proteobakterien sowie der Octadeca-5,11-diensäure in einer unbestimmten Art dieser Klasse (Hal 17b) zu werten. Obschon Bakterien verschiedener Taxa meist geringe Gehalte an Octadecadiensäuren synthetisieren, wird diese Substanzklasse in natürlichen Proben überwiegend auf den Beitrag durch Mikroeukarya, Plantae oder Fungi zurückgeführt (BOBBIE und WHITE, 1980; FEDERLE, 1986; FINDLAY *et al.*, 1986; ZELLES, 1997). Signifikante Gehalte einer strukturell unbestimmten Octadecadiensäure wurden von FUERST *et al.* (1993) von dem  $\alpha$ -Proteobakterium *Erythrobacter longus* beschrieben.

In Bakterien finden sich üblicherweise Octadecadiensäuren, deren Doppelbindungen durch eine Methyleninheit getrennt sind, wie z.B. die Octadeca-9,12-diensäure (Linolsäure) (VAINSHTEIN *et al.*, 1992; NICHOLS *et al.*, 1994; CARBALLEIRA *et al.*, 2001) oder die Octadeca-6,9-diensäure (GUCKERT *et al.*, 1986; KOBLÍŽEK *et al.*, 2003). Die Synthese der Octadeca-5,11-diensäure ist dagegen bis jetzt lediglich von dem Nacktsamer *Ginkgo biloba* und dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* bekannt (LONG und COE, 1976; WOLFF *et al.*, 1999). Ob auch die untersuchten  $\alpha$ -Proteobakterien zur Synthese der Octadeca-5,11-diensäure befähigt sind oder die Komponente einer exogenen Zufuhr entstammt, ist unklar.

Sowohl Cyclopropylcarbonsäuren als auch Hopanoide werden von zahlreichen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien, die den untersuchten Isolaten phylogenetisch nahe stehen, synthetisiert (ROHMER *et al.*, 1984; GROGAN und CRONAN, 1997). Insofern erscheint es zunächst ungewöhnlich, dass diese

#### 4 Bakterienkultivate aus Demospongiae (Sula-Rücken)

---

Substanzklassen in der untersuchten Vielzahl an Bakterien nicht beobachtet wurde. Möglicherweise kann ihre Abwesenheit in diesen Fällen damit erklärt werden, dass viele Bakterien zur Synthese von Cyclopropylcarbonsäuren und/oder Hopanoide veranlagt sind, beide Verbindungsklassen aber kein chemotaxonomisches Merkmal individueller Bakteriengruppen sind.

Die Beobachtung der guten Übereinstimmung der FA-Profile jeweiliger Kultivate der SAB und phylogenetisch nahe stehender Bakterien anderer Habitats (O'LEARY und WILKINSON, 1988; WILKINSON, 1988) weist darauf hin, dass sich die Biomarkeranalyse auf der Basis der Carbonsäuren auch zur Differenzierung von Bakterienpopulationen in Schwämmen eignet. Die Aussagekraft der Carbonsäuresignatur in Bakterienkonsortien ist gegenüber Isolaten allerdings aufgrund des Auftretens bestimmter Komponenten in zahlreichen Taxa, wie z.B. linear gesättigter und einfach ungesättigter Carbonsäuren, eingeschränkt.

Bekannt ist ferner, dass die Zusammensetzung der Membranlipide von Bakterien deutlich von den äußeren Bedingungen beeinflusst wird (GUCKERT *et al.*, 1986; RUSSELL und FUKUNAGA, 1990; OKUYAMA *et al.*, 1991; SUUTARI und LAAKSO, 1992; KIEFT *et al.*, 1994; POSPÍŠIL und REZANKA, 1994; NICHOLS *et al.*, 2000). So wurden beispielsweise erkennbare Unterschiede in den Carbonsäureprofilen gleicher Bakterienstämme bei Wachstum auf unterschiedlichen Nährmedien festgestellt (Daten hier nicht gezeigt). Es ist daher zu berücksichtigen, dass die quantitativen Membranzusammensetzungen in Kultivaten von denen korrespondierender Spezies in Schwammproben abweichen können. Das Ausmaß dieser Varianzen ist unbekannt. Da sich die beobachteten Carbonsäureprofile jedoch nur unwesentlich von den für Bakterien anderer Studien angegebenen unterscheiden, kann vermutet werden, dass die Abweichungen zu den im Schwammgewebe enthaltenen Bakterien geringfügig sind.



## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Das Inventar an mikrobiellen Lipidbiomarkern wurde von Angehörigen der Schwammklassen Hexactinellida und Demospongiae überprüft. Für die Untersuchungen standen 20 Hexactinellida- und 30 Demospongiae-Spezies zur Verfügung (Tabelle B1 im Anh.).

Vergleichsweise hohe Gehalte klassischer Biomarker für Bakterien, wie diverse estergebundene Fettsäuren (FA) und Hopanoide, wurden in den Lipidextrakten der Poriferen gefunden. Daneben wurden vormals für Porifera unbekannte FA beobachtet, für die aufgrund ihrer Struktureigenschaften mikrobielle Quellen zu vermuten sind. In den folgenden Kapiteln werden die in den untersuchten Schwämmen vorgefundenen bakteriellen Lipidklassen dargestellt und ihre Verteilung in ausgewählten Spezies diskutiert. Teile der hier gewonnenen Resultate sind in eine Publikationen eingegangen (THIEL *et al.*, 2002, im Anh.).

Eine Übersicht über die Anwendung von FA-Untersuchungen an natürlichem Probenmaterial wurde in Kapitel 4 gegeben. Als typische Lipidbestandteile der Eukaryoten und der Bakterien sind FA gemeinhin von hohem chemotaxonomischen Interesse. Die Relevanz der FA-Untersuchung wird beispielsweise durch die Beobachtung von RITCHIE *et al.* (2000) unterstrichen, die bei einer simultanen Untersuchung der Mikroorganismengemeinschaft in einer Bodenprobe mit Hilfe der 16S-rRNA-Gensequenzierung sehr gute Übereinstimmungen der Ergebnisse feststellten. Es ist bekannt, dass bakterielle und eukaryotische Glyko- und Phospholipide als vergleichsweise labile Komponenten einer Degradation bereits unter Umgebungsbedingungen gut zugänglich sind und demzufolge als Substanzklassen einer hohen Umsatzrate unterliegen (WHITE und FINDLAY, 1988). Die Analyse der überwiegend in Phospholipiden veresterten FA erfasst somit im Wesentlichen Zellen vitaler Organismen (WHITE *et al.*, 1979b).

Estergebundene FA sind neben Steroiden die quantitativ hervortretende Lipidklasse in den untersuchten Poriferen (BLUMENBERG, 2003). Basierend auf ihren Struktureigenschaften und der Länge ihrer Kohlenstoffketten kann der überwiegende Teil dieser Komponenten individuellen Quellorganismen der Pro- und Eukaryota zugeordnet werden (vgl. Kapitel 4). Da verschiedene Strukturmerkmale wie die Dichte der Skleren und der Choanocytenkammern den Lipidgehalt einer Schwammspezies prägen, ist die vergleichende quantitative Analyse mikrobieller Biomarker verschiedener Schwämme erschwert. So bleibt beispielsweise bei der Berechnung von Konzentrationen organischer Komponenten in Bezug zum Trockengewicht einer Probe die Sklerendichte, die die Ausbeute des Lipidextraktes beeinflusst, unberücksichtigt. Um aussagekräftige Ergebnisse der semi-quantitativen Analyse zu erzielen, erscheint daher die Berechnung von Anteilen am Lipidextrakt bzw. des Verhältnisses zu nicht mikrobiellen Komponenten sinnvoll.

Im Folgenden sollen die Komponenten untersucht werden, die entweder aufgrund ihres quantitativen Auftretens oder als Signaturlipide relevant sind. Zur Kennzeichnung der phylogenetischen Position unbestimmter („unknown“) Poriferen-Arten wurden für ihre Bezeichnung die Buchstaben *H* (Hexactinellida) und *D* (Demospongiae) benutzt.

### 5.1 Kurzkettige Monocarbonsäuren

Im Gemisch aus pro- und eukaryotischen Lipidkomponenten in den Schwämmen sind für die Zielsetzung dieser Arbeit zunächst die FA schwammassoziiierter Bakterien (SAB) für eine detaillierte Betrachtung einzugrenzen. In den Porifera-Spezies wurden sehr unterschiedliche Verteilungen verschieden strukturierter Monocarbonsäuren mit vorherrschenden Kettenlängen zwischen C<sub>12</sub> und C<sub>30</sub> gefunden (BLUMENBERG, 2003). Während einige Exemplare ein qualitativ und quantitativ recht komplexes Inventar an diesen Lipiden besitzen, wurden in anderen vergleichsweise geringe Gehalte und/oder einfachere Kompositionen beobachtet (Tabellen im Anh.). In Abb. 5.1 sind exemplarisch die Gaschromatogramme der FA-Fractionen aus den Demospongien *Thenea muricata* und *Geodia barretti* dargestellt. Für diese wies die Auszählung bakterieller Zellzahlen in Homogenisaten relativ geringe (*T. muricata*) bzw. dichte (*G. barretti*) Bakterienpopulationen auf (s. Tabelle 5.2).

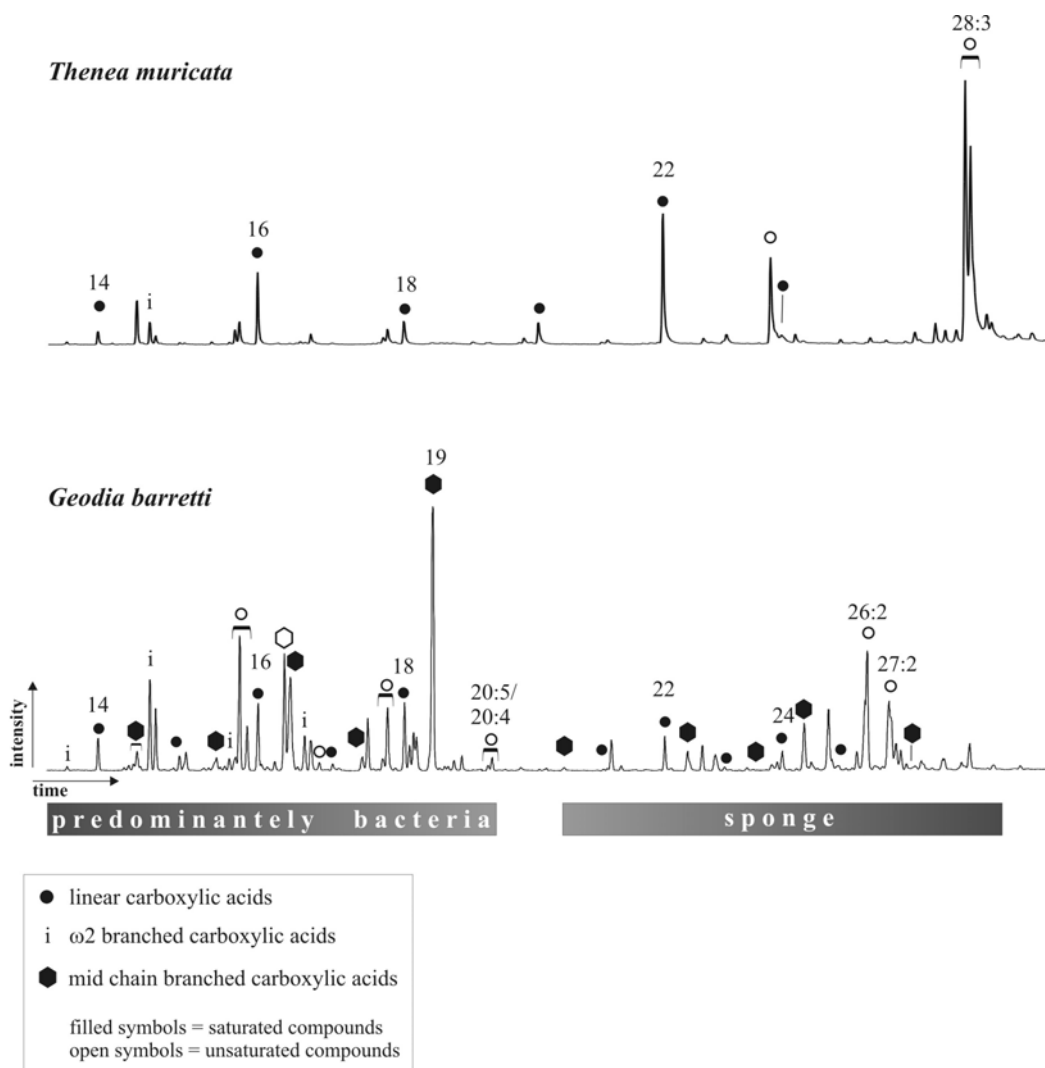


Abbildung 5.1 Partielle Gaschromatogramme der FAME aus *Thenea muricata* und *Geodia barretti*.

In *T. muricata* und *G. barretti* liegen sehr verschiedene Verteilungsmuster der FA vor. In dem bakterienarmen Schwamm *T. muricata* treten langkettige FA (> C<sub>20</sub>), im Folgenden LCFA (long

chain fatty acids) genannt, in Form der C<sub>28:3</sub>-Isomere („demospongiic acid“) gefolgt von der *n*-C<sub>22:0</sub> und der *n*-C<sub>24:1</sub> als Hauptkomponenten auf (BLUMENBERG, 2003). FA dieser Kettenlänge werden in Poriferen gemeinhin auf die Synthese durch den Wirtsorganismus zurückgeführt (JEFFERTS *et al.*, 1974; LITCHFIELD und MORALES, 1976). Kurzkettige FA ( $\leq C_{19}$ ), kurz SCFA (short chain fatty acids), die quantitativ von der *n*-C<sub>16:0</sub> dominiert werden, treten in *T. muricata* in vergleichsweise geringen Gehalten auf. In *G. barretti* ist die Gruppierung nach verschiedenen Kettenlängen deutlicher. In diesem Schwamm sind LCFA, von denen zweifach ungesättigte C<sub>26</sub>- und C<sub>27</sub>-FA hervortreten, in vergleichsweise geringen Anteilen vertreten. In hohen Relativkonzentrationen werden dagegen SCFA mit mehreren methylverzweigten Isomeren der C<sub>19</sub>-FA als dominante Verbindungen der Fraktion beobachtet.

Viele Verbindungsklassen der SCFA-Fractionen der Poriferen, wie lineare gesättigte und ungesättigte sowie terminal verzweigte FA, sind bereits aus den SAB-Isolaten bekannt. In Abb. 5.2 ist das Gaschromatogramm der FA-Fraktion aus *G. barretti* dem der FA-Fraktion des beispielhaft ausgewählten Proteobakteriums *Pseudoalteromonas carrageenovora* gegenübergestellt.

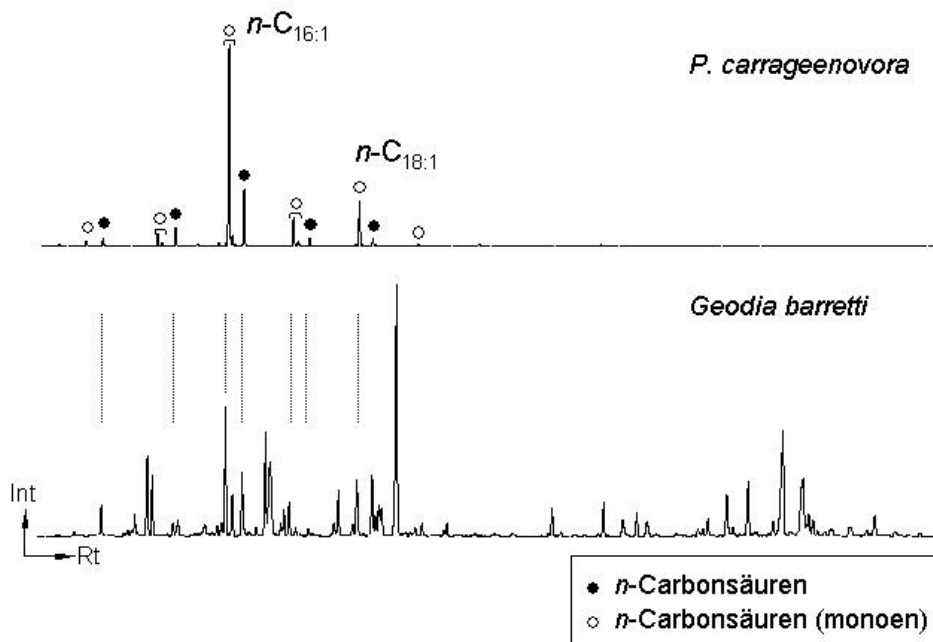


Abbildung 5.2 Gaschromatogramme der FAME aus *P. carrageenovora* und *G. barretti*.

Wie die FA-Verteilungen in den aus Poriferen isolierten Bakterien (Kapitel 4) und die Ergebnisse lipidchemischer Untersuchungen in der Literatur zeigen, werden von Bakterien üblicherweise divers strukturierte FA mit Ketten  $\leq C_{19}$  produziert. Es ist daher zu vermuten, dass relativ hohe Anteile der SCFA auf dichte Bakterienpopulationen in Poriferen zurückgeführt werden können. Ungeklärt sind zunächst die Produzenten – Schwamm oder Bakterien – spezifischer FA ‚mittlerer‘ Kettenlänge.

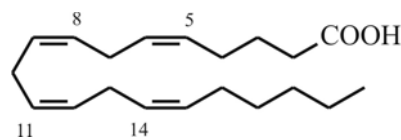
Bei den untersuchten Fraktionen aus Schwämmen hat sich gezeigt, dass die Zuordnung einzelner FA zu bakteriellen bzw. eukaryotischen Quellen auf der Grundlage ihrer C-Isotopensignaturen erschwert ist (s. Tabelle. 5.9). Als Hinweis auf den qualitativen Umfang der Bakterienkomponenten in den FA-Fractionen von Poriferen kann aber die allgemein beobachtete bimodale Verteilung der

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Komponenten in bakterienreichen Spezies herangezogen werden. Hiernach können für den weit überwiegenden Teil bakterieller Monocarbonsäuren Ketten mit maximal 19 C-Atomen angenommen werden. Es sind aus phylogenetisch diversen Bakterien anderer Habitats auch längerkettige gesättigte FA (bis C<sub>30</sub>) bekannt, jedoch sind diese hinsichtlich ihrer Verbreitung von untergeordneter Bedeutung (UCHIDA, 1974b; REZANKA *et al.*, 1987; LUQUIN *et al.*, 1991; ZELLES, 1997). Neben diesen sind ebenso längerkettige Komponenten hohen Unersättigungsgrads, wie die (n-3)-FA Eicosatetraen(C<sub>20:4</sub>)- und Eicosapentaensäure (C<sub>20:5n3</sub>), von zahlreichen Angehörigen der  $\gamma$ -Proteobacteria und der Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes-Gruppe in deutlichen Konzentrationen bekannt (YAZAWA, 1996; RUSSELL und NICHOLS, 1999; NICHOLS, 2003). Diese Komponenten wurden vornehmlich in psychrophilen Bakterien beobachtet, so dass deren Synthese als thermische Adaption der Zellmembran in diesen Organismen interpretiert wird (HAMAMOTO *et al.*, 1995).

Variable Gehalte an C<sub>20:4</sub> und C<sub>20:5</sub> treten auch in vielen der untersuchten Poriferen auf, wobei höchste Gehalte in als bakterienarm eingestuften Arten wie *Mycale lingua* oder *Haliclona* sp. 2 beobachtet wurden (BLUMENBERG, 2003; HOFFMANN, 2003). Die Untersuchung ihrer Pyrrolidin-Derivate zeigte darüber hinaus, dass es sich bei erstgenannter Komponente um die C<sub>20:4n6</sub> (5,8,11,14-Eicosatetraensäure; Arachidonsäure, Abb. 5.3) handelt. Wie erwähnt wird diese Komponente auch von meist psychrophilen Bakterien erzeugt (RUSSELL und NICHOLS, 1999), sie findet in der Natur aber ihre Hauptverbreitung in den Eukaryoten (LECHEVALIER und LECHEVALIER, 1988), in denen sie häufig eine Vorstufe der regulatorisch wirksamen Eicosanoide (Gewebehormone) ist. Aus diesem Grund wurde die Arachidonsäure wie auch weitere C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Polyensäuren in mehreren Studien an marinen Sedimenten als typische Markerverbindungen von Mikroalgen genutzt (VOLKMAN und JOHNS, 1977; VOLKMAN *et al.*, 1980; GILLAN und HOGG, 1984; WOOD, 1988).

Anreicherungsexperimente von ZIMMERMAN *et al.* (1990) mit dissoziierten Zellen zeigten ferner, dass die Arachidonsäure in den Choano- und Archaeocythen des tetractinomorphen Schwammes *Tethya aurantia* lokalisiert sind, während sie in der Fraktion der SAB-Zellen lediglich mit geringem Anteil vertreten ist. Es kann daher vermutet werden, dass die Arachidonsäure in den untersuchten Proben eine authentische Schwammkomponente ist.



**Abbildung 5.3** Strukturformel der Arachidonsäure.

Die vorher genannten Beobachtungen zu Grunde legend, wurden für die Analyse der Monocarbonsäuren aus SAB die Komponenten  $\leq$  C<sub>19</sub> (SCFA) herangezogen. In Tabelle 5.1 sind die Anteile potenziell bakterieller Verbindungen am FA-Inventar sowie der morphologische Habitus von 30 Demospongien und 3 Hexactinelliden aufgeführt. Für die weiteren Hexactinellida wurden diese Werte nicht bestimmt. Die relativen Gehalte individueller Komponenten am Gesamtinventar der jeweiligen Spezies sind im Tabellenwerk im Anhang dargestellt.

Aufgrund der deutlich verschiedenen Zelldimensionen (s. Kapitel 2) ist bei dieser Betrachtung zu berücksichtigen, dass aus den Einzelzellen möglicher Quellorganismen – Bakterien oder Poriferen – ungleiche Gehalte an Membrancarbonsäuren hervorgehen. Diese Werte geben daher nicht die Anteile der Bakterienzellen am Gesamtzellinventar der Schwämme wieder.

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

**Tabelle 5.1** Anteile der SCFA ( $\leq C_{19}$ ) an der FA-Fraktion ausgewählter Poriferen.

		Gew.-[%]	Habitus
<b>HEXACTINELLIDA</b>			
Lyssakinosa	Rossellidae		
	<i>Sympagella</i> sp. nov	12,6	+
Hexactinosida	Euretidae		
	<i>Ipheton panicea</i>	12,3	+
Amphidiscosida	Hyalonematidae		
	<i>Hyalonema</i> sp. 1	74,9	+
<b>DEMOSPONGIAE</b>			
Homosclerophorida	Plakinidae	<i>Plakortis simplex</i>	↗
Tetractinomorpha			
Astrophorida	Ancorinidae	<i>Stryphnus ponderosus</i>	●
		<i>Dragmastra normanii</i>	●
	Geodiidae	<i>Geodia barretti</i>	●
		<i>Geodia macandrewii</i>	●
		<i>Isops phlegraei</i>	●
		<i>Pachymatisma johnstonii</i>	●
	Theneidae	<i>Thenea muricata</i>	●
Hadromerida	Polymastiidae	<i>Tentorium semisuberites</i>	+
Ceractinomorpha			
Poecilosclerida	Microcionidae	<i>Antho dichotoma</i>	+
		<i>Clathria barleii</i>	+
	Hymedesmiidae	<i>Hymedesmium</i> sp.	≡
	Myxillidae	<i>D-unknown</i> sp. 1	≡
		<i>D-unknown</i> sp. 2	≡
	Coelospheridae	<i>Forcepia forcipis</i>	+
	Mycalidae	<i>Mycale lingua</i>	+
Haplosclerida	Phloeodictyidae	<i>Oceanapia robusta</i>	●
	Chalinidae	<i>Haliclona</i> sp. 1	●
		<i>Haliclona</i> sp. 2	+
		<i>Haliclona urceolus</i>	+
	Petrosiidae	<i>Petrosia crassa</i>	●
	Niphatidae	<i>Hemigellius puniceus</i>	+
Halichondrida	Axinellidae	<i>Phakellia ventilabrum</i>	↘
		<i>Phakellia robusta</i>	+
		<i>Axinella rugosa</i>	+
		<i>Axinella infundibuliformis</i>	+
	Halichondridae	<i>Spongosorites genitrix</i>	≡
		<i>Hymeniacion aff. fallax</i>	≡
Dendroceratida	Darwinellidae	<i>Dendrilla cirsioides</i>	+
		<i>D-unknown</i> sp. 3	≡
	Dysideidae	<i>D-unknown</i> sp. 4	+
	?	<i>D-unknown</i> sp. 5	≡

Aufgrund von Koelutionen mit Komponenten, die nicht den Carbonsäuren angehören, wurden die Anteile in *Plakortis simplex*, *Phakellia ventilabrum* und *Axinella rugosa* anhand von Ionenspuren im Messlauf geschätzt: ↗ und ↘ = relativ hoch bzw. niedrig. Habitus: + = aufgerichtet, ● = massig, globulär, ≡ = inkrustierend.

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

---

Die Ergebnisse in Tabelle 5.1 zeigen, dass sehr unterschiedliche prozentuale Anteile der SCFA (z.B. 4,1 Gew.-% *Mycale lingua*, 74,8 Gew.-% in *Phakellia robusta*) am FA-Inventar in den Poriferen vorliegen. Eine Beziehung zwischen der phylogenetischen Zugehörigkeit eines Schwammes und seines Gehalts an wahrscheinlich bakteriellen FA ist nicht erkennbar. Im Gegensatz dazu scheint allgemein ein Zusammenhang zwischen der äußeren Form einer Art und der Gehalte der untersuchten Komponenten zu bestehen. Hiernach verfügen insbesondere kompakt gebaute Poriferen über hohe Gehalte an SCFA. Es kann daher für die bearbeiteten Poriferen der Schluss gezogen werden, dass Exemplare mit hohem inneren Volumen (großem Mesohylanteil) bevorzugt hohe Gehalte an bakterieller Biomasse besitzen.

Wie die Werte demonstrieren, ist anhand der Anteile der SCFA an der FA-Fraktion eine generelle Differenzierung von Poriferen in *Bacteriosponges* und non-*Bacteriosponges*, wie sie von REISWIG (1981) vorgeschlagen wurde, nur eingeschränkt möglich. Vielmehr existieren daneben auch Poriferen mit Bakterienpopulationen moderater Dichte, die von dieser Einteilung nicht erfasst werden.

Das SCFA-Inventar in Hexactinellida und Demospongiae umfasst zahlreiche Substanzklassen, die in variablen Anteilen in den jeweiligen Spezies vorliegen. Abb. 6.4 zeigt die prozentualen Anteile der in den Demospongiae und Hexactinellida vertretenen SCFA-Gruppen.

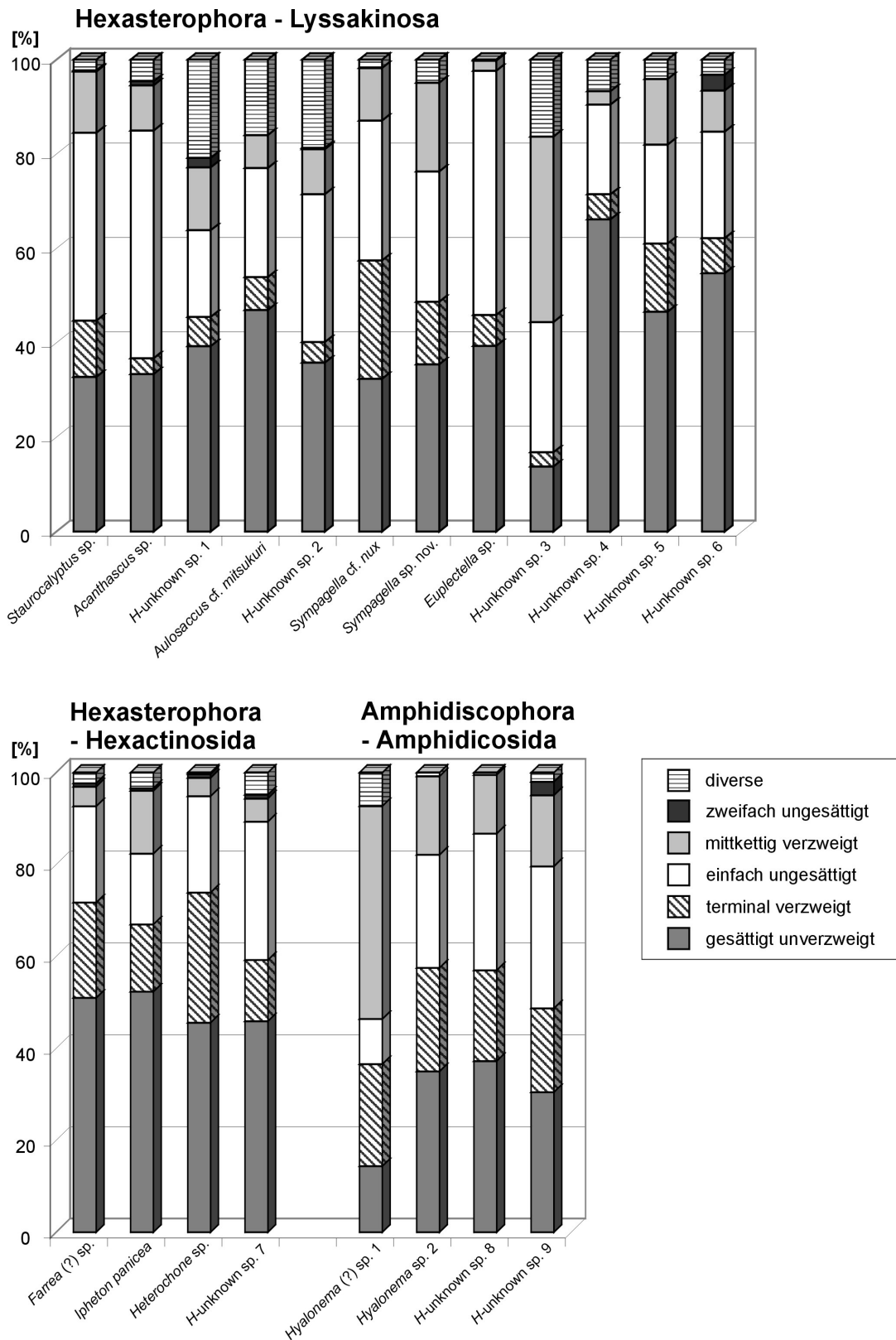
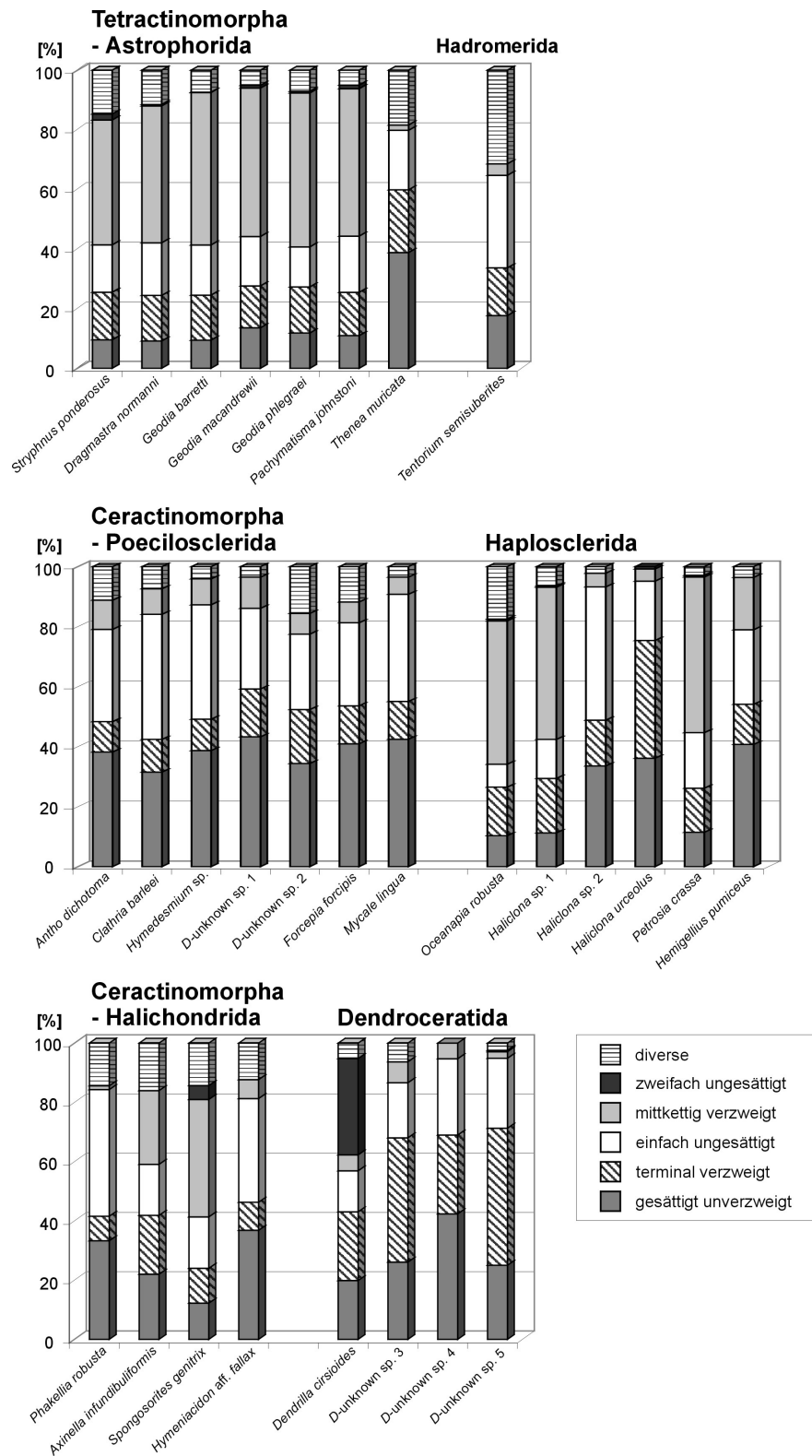


Abbildung 5.4 Verteilung dominanter SCFA-Klassen in Demospongiae und Hexactinellida ( $\Sigma$  mittkettig verzweigt inklusive ungesättigter Verbindungen).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Fortsetzung Abb. 5.4



**Abbildung 5.4** Verteilung dominanter SCFA-Klassen in Demospongiae und Hexactinellida ( $\Sigma$  mittkettig verzweigt inklusive ungesättigter Verbindungen).



Nachfolgend sollen die SCFA-Klassen vor dem Hintergrund der Bakteriendichte in allen Schwämmen dargestellt werden. Für die semiquantitative Analyse dieser Biomarker wurden hinsichtlich ihrer Aussagekraft zwei Betrachtungsarten zu Grunde gelegt:

- I) Der prozentuale Anteil einer Substanzklasse an den SCFA (kurzkettigen FA) soll Auskunft über die quantitative Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in einem Schwamm geben. Diese mathematische Betrachtungsweise wurde z.B. für die Resultate in Abb. 5.4 herangezogen. Da im Vergleich zu bakterienarmen Exemplaren in bakterienreichen Poriferen individuelle Substanzklassen stark hervortreten, treten weitere Bakterienverbindungen anteilig zurück. Nachteil dieser Methode ist, dass vergleichsweise hohe Absolutkonzentrationen dieser Komponenten in bakterienreichen Schwämmen numerisch nicht erfasst werden.
- II) Durch den Bezug der relativen Konzentrationen spezifischer SCFA-Klassen auf die Konzentrationen langkettiger FA ( $> C_{19}$ , LCFA) können Hinweise zu den absoluten Beiträgen unterschiedlicher Bakteriengruppen in einem Schwammexemplar erzielt werden. Vorteil dieser Methode ist, dass weitere SCFA-Klassen, deren Konzentrationen in den Schwammspezies sehr verschieden sind, unberücksichtigt bleiben. Für den Vergleich der Mengenverhältnisse in verschiedenen Schwämmen wird vorausgesetzt, dass von den jeweiligen Spezies adäquate Anteile der LCFA als Bezugsgröße (conc. LCFA = 1,0) an der Biomasse synthetisiert werden. Aus diesem Grund sind die nach dieser Methode errechneten Beiträge ebenfalls als Abschätzungen einzustufen.

Im Folgenden werden die prozentualen Anteile (in Gew.-%) von SCFA-Klassen einer Spezies am SCFA-Inventar angegeben (Methode I). Für die vergleichende Darstellung der SCFA-Beiträge in verschiedenen Demospongiae wurden diese dagegen überwiegend als Mengenverhältnis in Bezug zu den LCFA nach der Methode II betrachtet.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die untersuchten Demospongiae anhand ihrer SCFA-Gehalte am FA-Inventar (Tabelle 5.1) eingeordnet. Spezies, die aufgrund hoher SCFA-Anteile vorläufig den *Bacteriosponges* zugerechnet werden, finden sich in den oberen Teilen der Abbildungen.

### 5.1.1 Gesättigte *n*-Fettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

Kurzkettige *n*-FA (*n*-SCFA) sind in der Natur verbreitete Verbindungen, die sowohl aus Bakterien als auch aus Eukaryoten bekannt sind (STRYER, 1995). In allen untersuchten Poriferen wurden diese Verbindungen mit Kettenlängen zwischen  $C_{12}$  und  $C_{19}$  beobachtet. Hauptkomponenten der Verbindungsklasse sind die  $n$ - $C_{16:0}$  oder die  $n$ - $C_{18:0}$ . In bakterienreichen Schwämmen nehmen die  $n$ - $C_{16:0}/n$ - $C_{18:0}$ -Verhältnisse meist Werte  $> 1$  ein.

In den Demospongiae wurden *n*-SCFA mit variablen Anteilen am kurzkettigen Inventar zwischen 9,2 (*D. normanii*) bis 43,3 % (*D*-unknown sp. 1, Myxillidae) gefunden (Tabelle in Anh. C). Höhere Gehalte mit typischen Anteilen von 30 bis 55 % und einem Maximalwert von 66,1 % (*H*-unknown sp. 4) liegen dagegen gemeinhin in den Hexactinellida vor.

Die Zusammenhänge zwischen dem SCFA-Gehalt und dem Verhältnis der *n*-SCFA zu LCFA verdeutlicht Abb. 5.5.

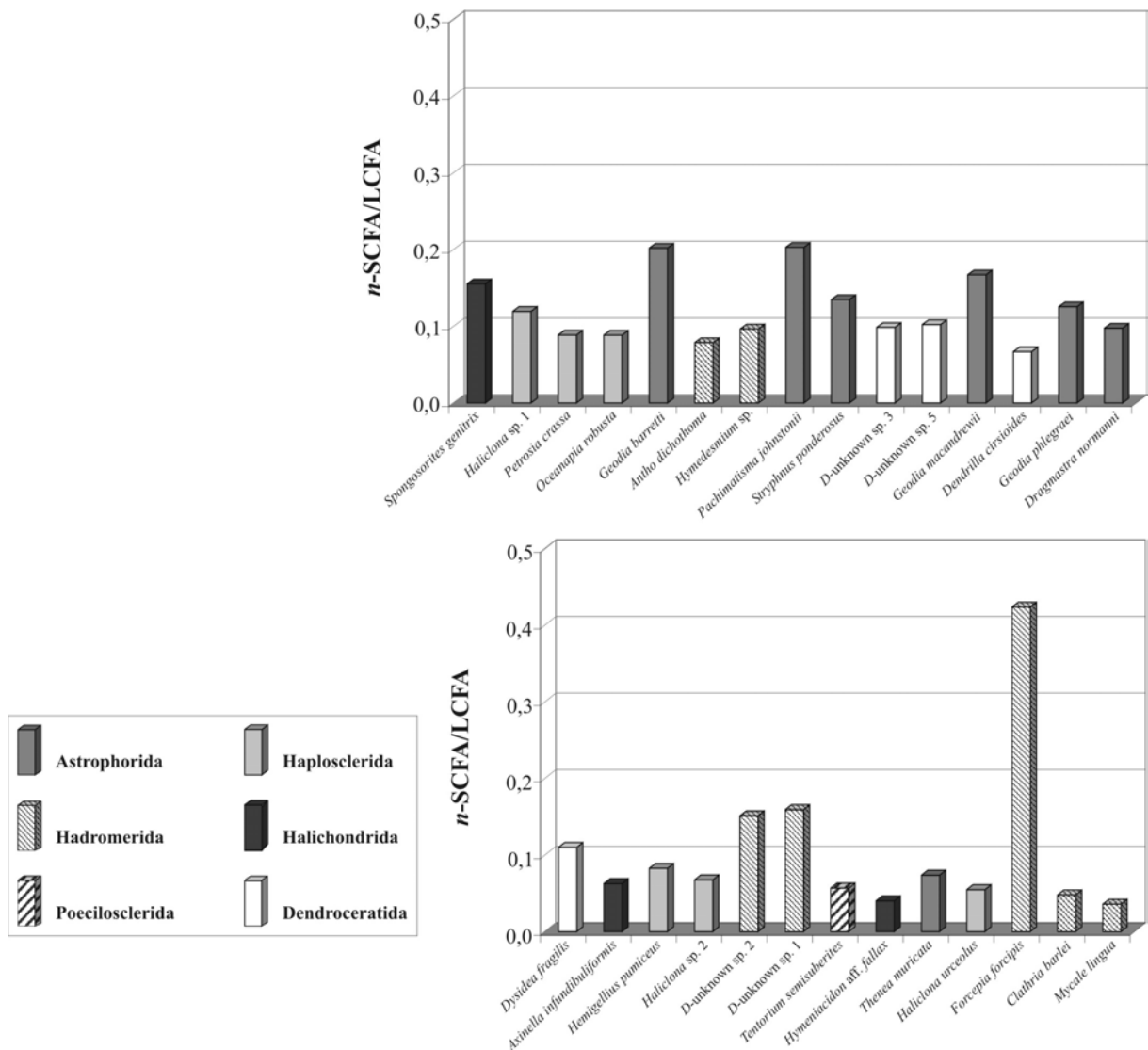


Abbildung 5.5 Mengenverhältnisse *n*-SCFA/LCFA in Demospongiae.

Aus Abb. 5.5 ist zu erkennen, dass mit wenigen Ausnahmen (z.B. *Forcepia forcipis*) ähnliche *n*-SCFA/LCFA-Verhältnisse unabhängig von dem Gehalt kurzkettiger, potenziell bakterieller FA in den Schwämmen vorliegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass vergleichsweise dichte Bakterienpopulationen in jeweiligen Schwammexemplaren keine deutlich erhöhten Anteile von *n*-SCFA zur Folge haben. Die Ergebnisse aus dem poeciloscleriden *F. forcipis* zeigen, dass auch in bakterienarmen Exemplaren hohe Relativgehalte an *n*-SCFA vorliegen können.

### Diskussion

*n*-SCFA, die prokaryotischen und eukaryotischen Quellen entstammen können, wurden in allen Schwämmen nachgewiesen. In nahezu allen Organismen treten die FA mit 14, 16 und 18 C-Atomen auf, und für Gram-negative Bakterien wurde vielfach die bevorzugte Synthese der *n*-C<sub>16:0</sub> gegenüber der *n*-C<sub>18:0</sub> beobachtet (PERRY *et al.*, 1979; LECHEVALIER und LECHEVALIER, 1988; CAVIGELLI *et al.*, 1995). In Mikroeukeyoten wurden dagegen umgekehrte Verhältnisse festgestellt (WHITE *et al.*,

1996). Interessanterweise ist aber für die untersuchten *Bacteriosponges* ein relativ erhöhter Anteil der  $n$ -C<sub>16:0</sub> im Vergleich zu den bakterienarmen Schwämmen nicht festzustellen.

Aus Abb. 5.5 geht hervor, dass das Verhältnis der  $n$ -SCFA/LCFA mit wenigen Ausnahmen in den Schwämmen sehr ähnlich ist. Der Schluss liegt nahe, dass der Beitrag von  $n$ -SCFA durch SAB im Vergleich zu dem der Schwammzellen allgemein gering ist.

### 5.1.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

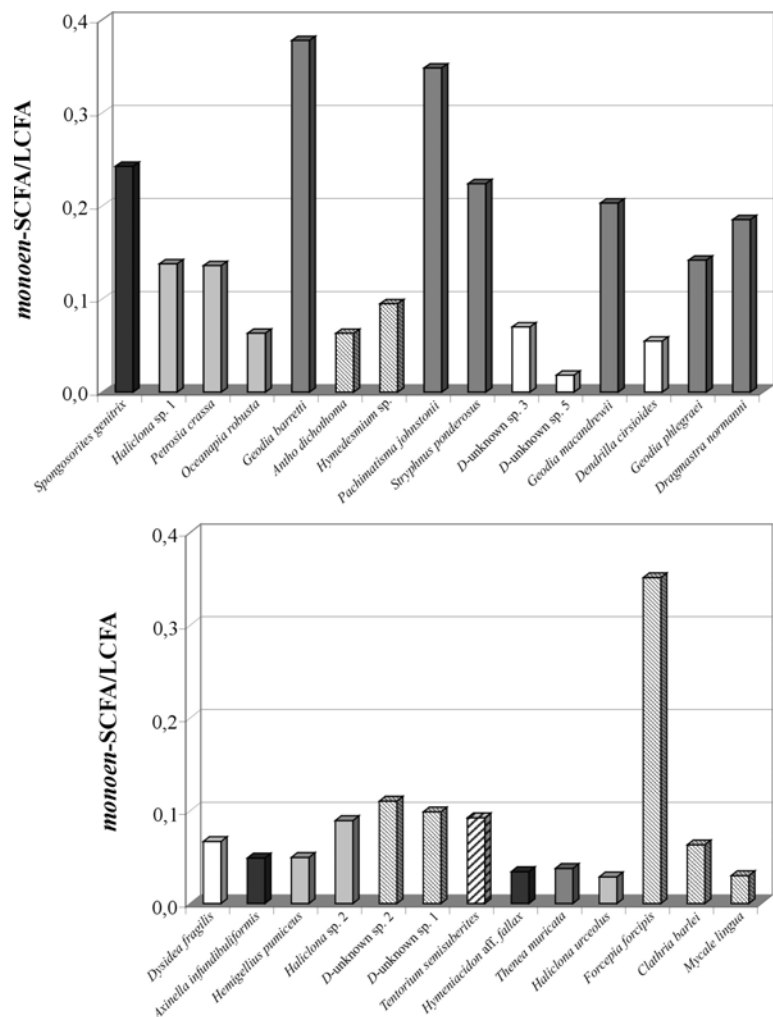
Einfach ungesättigte monoen-SCFA werden im marinen Bereich gemeinhin auf die Präsenz Gram-negativer Bakterien zurückgeführt (PARKES und TAYLOR, 1983), wengleich sie auch in diversen Gram-positiven Bakterien sowie Mikroalgen gefunden wurden (GILLAN und HOGG, 1984; ZELLES, 1999).

In allen Poriferen wurden monoen-SCFA mit typischen Kettenlängen zwischen C<sub>14</sub> und C<sub>19</sub> beobachtet. Anhand ihrer relativen Retentionszeiten können in einer Schwammspezies bis zu vier Isomere einer monoen-FA unterschieden werden. Wie mit Hilfe der DMDS- und Pyrrolidin-Derivatisierung festgestellt wurde, sind in den Demospongien üblicherweise Hexadec-9-ensäure, Octadec-9-ensäure oder Octadec-11-ensäure die Hauptkomponenten (s. auch BLUMENBERG, 2003). Ausnahmen unter den Demospongien sind *Tentorium semisuberites* und *Hymedesmium* sp., in denen die Heptadec-6-ensäure bzw. die Heptadec-9-ensäure die dominierenden Komponenten der monoen-FA sind.

Die Anteile von monoen-Carbonsäuren am SCFA-Inventar der Poriferen sind sehr verschieden und liegen für die Demospongiae zwischen 7,0 (*Oceanapia robusta*) und 44,4 Gew.-% (*Haliclona* sp. 2) und für hexactinellide Poriferen zwischen 9,8 (*Hyalonema* sp. 1) und 51,7 Gew.-% (*Euplectella* sp.). Die Gehalte der monoen-SCFA in Bezug zu den LCFA gegen die Gehalte der SCFA sind in Abb. 5.6 dargestellt.

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Abb. 5.6 demonstriert die sehr unterschiedliche Verteilung der monoen-FA in den Demospongiae. Neben vielen Exemplaren, die vergleichsweise geringe Gehalte der monoen-SCFA besitzen, zeichnen sich andere Spezies durch relativ hohe Gehalte ( $\text{mono-en-SCFA/LCFA} > 0,15$ ) dieser Komponenten aus. Letztere gehören überwiegend den Astrophorida sowie den Poecilosclerida und Halichondrida an, und es wurden höchste Relativgehalte der monoen-SCFA in *Phakellia robusta*, *Geodia barretti*, *Pachymatisma johnstonii* und *Forcepia forcipis* beobachtet. Neben weiteren astrophoriden Poriferen verfügen auch Vertreter der Haplosclerida wie *Haliclona* sp. 1, *Petrosia crassa* und der Halichondrida (*Spongosorites genitrix*) über hohe Gehalte einfach ungesättigter SCFA.



**Abbildung 5.6** Mengenverhältnisse von mono-en-SCFA/LCFA in Demospongiae (Legende s. Abb. 5.5).

### Diskussion

Die Klasse einfach ungesättigter SCFA, und insbesondere die Hexadecen- und die Octadecensäure, sind als typische Membranlipidbestandteile nicht nur aus bakteriellen, sondern auch aus eukaryotischen Zellen bekannt. Eine Quellzuordnung wurde durch die Analyse der an  $\omega 7$  bzw.  $\omega 9$  ungesättigten Isomere der  $C_{16:1}$  und  $C_{18:1}$  vorgenommen. Für Bakterien wurde beispielsweise aufgrund ihrer Dominanz in marinen Sedimenten die Vaccensäure ( $C_{18:1}\Delta^{11}$ ) als Signaturfettsäure vorgeschlagen (VOLKMAN und JOHNS, 1977; PERRY *et al.*, 1979). In vielen Studien und auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in zahlreichen marinen Bakterien die  $C_{16:1}\Delta^9$  signifikant hervortritt, während die  $C_{18:1}\Delta^{11}$  nur untergeordnet vertreten ist. In marinen Eukaryoten wurde dagegen vielfach die  $C_{18:1}\Delta^9$  (Oleinsäure) und die  $C_{16:1}\Delta^9$  gefunden (VOLKMAN *et al.*, 1980; GILLAN und HOGG, 1984).

ZIMMERMAN *et al.* (1989) stellten bei Anreicherungsexperimenten mit Zellen aus dem Schwamm *Pseudoaxynissa* sp. relativ hohe Gehalte der  $C_{18:1}\Delta^9$  vorwiegend in den Schwammzellen geringer Größe, wie den Pinakocyten und Choanocyten, fest. In einer erweiterten Arbeit an *Tethya aurantia*, in der neben der  $C_{18:1}\Delta^9$  auch die  $C_{18:1}\Delta^{11}$  deutlich konzentriert vorkam, wurde gezeigt, dass beide Verbindungen in verschiedenen Zellen auftreten und dass die Vaccensäure vorwiegend in den

Fraktionen der Symbiontzellen lokalisiert ist (ZIMMERMAN *et al.*, 1990). Aus diesen Beobachtungen folgt, dass Schwammzellen potente Produzenten einfach ungesättigter FA sind und demgemäß auch in bakterienarmen Schwämmen hohe Gehalte der monoen-SCFA vorliegen.

Abb. 5.6 veranschaulicht, dass tendenziell das Verhältnis monoen-SCFA/LCFA in bakterienreichen Schwämmen erhöht ist. Dieser Befund unterstreicht, dass SAB der untersuchten Kaltwasserporiferen Träger von monoen-FA sind. Im Vergleich aller Schwämme treten monoungesättigte SCFA aber mit unregelmäßigen Anteilen am SCFA-Inventar auf. Vielfach weisen bakterienreiche Schwämme vergleichsweise geringe Anteile der monoen-FA am SCFA-Inventar auf, was zeigt, dass der Beitrag einfach ungesättigter FA, die durch SAB synthetisiert werden, gegenüber anderen SCFA relativ zurücktritt.

Auffallend ist, dass eine Beziehung zwischen dem  $C_{16:1}\Delta^9/C_{18:1}\Delta^{11}$ -Verhältnis und dem Bakterienreichtum der untersuchten Schwämme besteht. So werden in Demospongien und dem hexactinelliden *Hyalonema* sp. 1, die dichte Bakterienpopulationen enthalten, in der Regel  $C_{16:1}\Delta^9/C_{18:1}\Delta^{11}$ -Verhältnisse  $> 1,5$  gemessen, während in bakterienarmen Schwämmen deutlich geringere Werte errechnet wurden. Diese Beobachtung zeigt, dass, wie beispielsweise auch in zahlreichen Alteromonadales-Vertretern (s. Kapitel 4.2.2), in SAB allgemein die  $C_{16:1}$  in deutlich höheren Anteilen als die  $C_{18:1}$  vertreten ist.

### 5.1.3 Zweifach ungesättigte Fettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

Die Synthese zweifach ungesättigter SCFA in hohen Konzentrationen wurde in verschiedenen Bakterien und Mikroeukaryoten beobachtet. Unter den Eukaryoten treten dien-FA vornehmlich in verschiedenen Fungi und Pflanzen und untergeordnet in Protozoen, Cnidarien und Poriferen auf (MADRIGAL und SMITH JR., 1975; LÖSEL, 1988; REZANKA, 1993; CARBALLEIRA und MEDINA, 1994; CARBALLEIRA *et al.*, 1997a; ZELLES, 1997). In Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wie z.B. einigen in dieser Arbeit untersuchten  $\alpha$ -Proteobakterien, sowie weiteren  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakterien sind ebenfalls dien-SCFA, wenn auch meist in geringen Konzentrationen, gefunden worden (s. Kapitel 4.2.3). Ferner wurde die Substanzklasse in vielen Poriferen als Nebenbestandteil der Lipidfraktion beobachtet. Während in der Natur offensichtlich Octadecadiensäuren und speziell die Octadeca-9,12-diensäure (Linolsäure) die am häufigsten vertretenen dien-FA sind, wurde in Schwammextrakten oftmals auch die Octadeca-5,9-diensäure festgestellt (AYANOGLU *et al.*, 1983; GILLAN *et al.*, 1988; ZIMMERMAN *et al.*, 1990; CHRISTIE *et al.*, 1992; DEMBITSKY *et al.*, 1993; GARSON *et al.*, 1994).

In den untersuchten Poriferen wurden zweifach ungesättigte SCFA anhand typischer relativer GC-Retentionszeiten und charakteristischer MS-Fragmentierungen ihrer ME-Derivate gefunden. Die Bestimmung der  $\Delta$ -Positionen wurde von BLUMENBERG (2003) anhand der Fragmentierung ihrer Pyrrolidin-Derivate und DMDS-Addukte durchgeführt.

### Diskussion

Natürliche dien-SCFA sind rar und auf wenige eukaryotische und bakterielle Organismengruppen beschränkt. Dien-SCFA sind mit Ausnahme der Cyanobacteria selten in Bakterien vorhanden und finden sich gelegentlich in moderaten Konzentrationen in Ciliophoren und Schwämmen. In Letzteren sind häufig, wie auch in den Exemplaren dieser Arbeit, an  $\Delta^{5,9}$  oder seltener an  $\Delta^{6,11}$  ungesättigte FA vertreten (CARBALLEIRA und MALDONADO, 1989b; ZIMMERMAN *et al.*, 1989; GARSON *et al.*, 1994). Die aus vielen Eukaryoten und vereinzelt Bakterien bekannte Octadeca-9,12-diensäure wurde dagegen bis jetzt in Schwammexemplaren nur in Spurenkonzentrationen gefunden (ZIMMERMAN *et al.*, 1989).

Das Fehlen der  $\Delta^{5,9}$  oder  $\Delta^{6,11}$ -FA in Bakterien lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass zweifach ungesättigte SCFA in den Poriferen keine bakteriellen Synthese- bzw. Transformationsprodukte sind, sondern den Schwammzellen entstammen. Zu gleichen Ergebnissen kamen die Bearbeiter unabhängig voneinander durchgeführter Anreicherungsstudien von aus Schwämmen gewonnenen Zellen mittels Dichtegradienten, in denen Octadecadiensäuren weit überwiegend mit den Schwammzellen (Choano- und Archaeocythen) assoziiert vorgefunden wurden (ZIMMERMAN *et al.*, 1989; ZIMMERMAN *et al.*, 1990). GILLAN *et al.* (1988) fanden in fünf Schwämmen des Great-Barrier-Reefs bisweilen hohe Gehalte (bis etwa 10 Gew.-% der FA-Fraktion) der Octadeca-5,9-diensäure und vermuteten, dass das für die Untersättigung der LCFA verantwortliche  $\Delta^{5,9}$ -Desaturase-Enzymsystem auch an SCFA wie C<sub>18</sub>-FA aktiv wird.

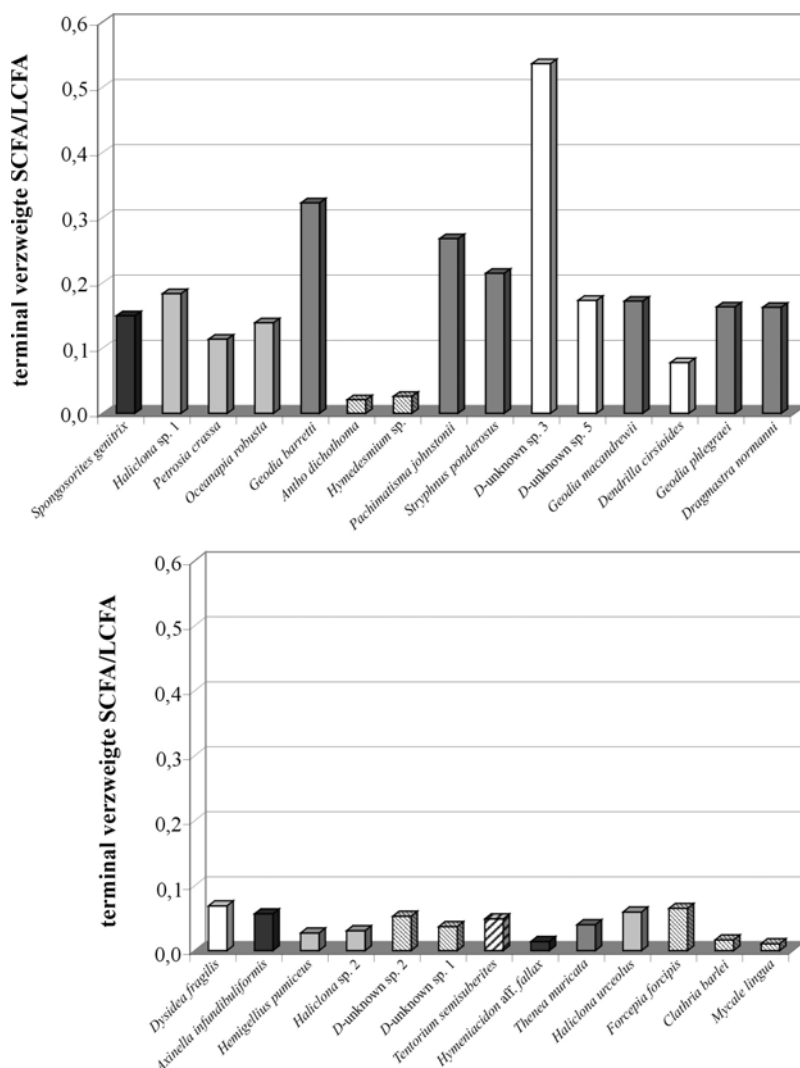
### 5.1.4 Terminal methylverzweigte Fettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

*Iso(i)-* und *anteiso(ai)-* methylverzweigte SCFA sind übliche Lipidbestandteile Gram-positiver und untergeordnet Gram-negativer Bakterien (s. Kapitel 4.2.4). In letztgenannter Gruppe wurden gesättigte und einfach ungesättigte Homologe von *i-* und *ai-*FA insbesondere in anaeroben Bakterien wie z.B. Sulfat reduzierenden Gattungen beobachtet (BOON *et al.*, 1977; UEKI und SUTO, 1979; TAYLOR und PARKES, 1983).

SCFA mit endständiger Methylverzweigung wurden mit C<sub>13</sub>- bis C<sub>19</sub>-Komponenten in den Demospongiae und den Hexactinellida gefunden. Als Hauptkomponenten dieser Lipidklasse tritt vielfach die *i-C*<sub>15:0</sub> auf, und speziell in *Bakterienschwämmen* sind *i-* und *ai-C*<sub>15:0</sub> die dominanten Verbindungen. In seltenen Fällen wurden die *i-C*<sub>17:0</sub>, die *ai-C*<sub>17:0</sub>, die *ai-C*<sub>18:0</sub> oder die *i-C*<sub>19:0</sub> als quantitativ stärkste endständig verzweigte SCFA in den Poriferen beobachtet. Für viele Spezies wurde die Abwesenheit einzelner Strukturäquivalente, wie z.B. der *i-C*<sub>18:0</sub>, der *ai-C*<sub>14:0</sub> und der *ai-C*<sub>18:0</sub>, festgestellt. Mit 8,3 bis 46,2 Gew.-% (Demospongiae) bzw. 3,0 bis 37,6 Gew.-% (Hexactinellida) an den potenziell bakteriellen FA treten terminal monomethylverzweigte SCFA in sehr verschiedenen Anteilen in den Poriferen auf.

Die Darstellung der Mengenverhältnisse terminal verzweigter SCFA/LCFA in den Demospongiae ist in Abb. 5.7 gegeben.

**Abbildung 5.7**

Mengenverhältnisse von terminal methylverzweigten SCFA/LCFA in Demospongiae (Legende s. Abb. 5.5).

In Abb. 5.7 ist erkennbar, dass bakterienreiche Poriferen in Bezug zu LCFA relativ hohe Anteile terminal verzweigter FA beinhalten. SCFA mit terminaler Methylverzweigung sind z.B. in Angehörigen der Astrophorida, der Haplosclerida und der Halichondrida quantitativ hervortretend. Interessant sind ferner hohe Gehalte terminal verzweigter SCFA in zwei dendroceratiden Poriferen (*D-unknown sp. 3* und *5*), in denen keine weiteren Bakterien-SCFA mit relativ erhöhten Gehalten vorgefunden wurden.

### Diskussion

Die Verteilungsmuster terminal verzweigter FA vieler Demospongiae und Hexactinellida ähneln denen von Bakterien mit hohem Gehalt an *i-/ai*-SCFA. Signifikante Gehalte endständig verzweigter FA wurden sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen, überwiegend anaerob lebenden Bakterien festgestellt (s. Kapitel 4.2.4). Mehrfach sind Angehörige der Klasse der Bacilli als potente Produzenten von *i-* und *ai*-FA beschrieben (O'LEARY und WILKINSON, 1988; BEHME *et al.*, 1996; CARBALLEIRA *et al.*, 2001), und auch in dem aus *Plakortis simplex* isolierten *Bacillus* sp. (P MBA 215) wurden diese Komponenten in hohen Konzentrationen festgestellt (Kapitel 4.2.4). Ebenso sind *i-* und *ai*-FA in vielen Vertretern der Actinomycetales quantitativ hervortretende Membranlipidbestandteile (EMBLEY *et al.*, 1987; KANEDA, 1991; NIEPEL, 1999). Angehörige beider Gram-positiver Phyla, der Firmicutes und der Actinobacteria, wurden in mehreren Untersuchungen in Schwämmen nachgewiesen (s. Kapitel 2.5.1) und sind mögliche Produzenten der *i-* und *ai*-FA in den untersuchten Poriferen.

Gesättigte und einfach ungesättigte terminal verzweigte FA, bevorzugt mit 15 bzw. 17 C-Atomen, wurden auch in der Gattung *Desulfovibrio* beobachtet (UEKI und SUTO, 1979; DOWLING *et al.*, 1988; VAINSHTEIN *et al.*, 1992; FEIO *et al.*, 1998), so dass in vielen Studien an komplexen Proben das

Auftreten dieser diskreten Verbindungen auf den Eintrag durch Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien zurückgeführt wurde. Der Nachweis von Angehörigen dieses Taxons als Mitglieder der SAB-Gemeinschaft wurde ebenfalls von einigen Schwämmen beschrieben (IMHOFF und TRÜPER, 1976; SCHUMANN-KINDEL *et al.*, 1997; HOFFMANN, 2003), so dass auch sie als mögliche Produzenten endständig verzweigter FA in Schwämmen betrachtet werden.

Gemäß den Literaturangaben und den eigenen Ergebnissen aus Kapitel 5 sind im Vergleich mit den weiteren terminal verzweigten SCFA die *ai*-C<sub>14:0</sub>, *i*-C<sub>18:0</sub> und/oder *ai*-C<sub>18:0</sub> in Bakterien, wenn vorhanden, gemeinhin in sehr geringen Konzentrationen vertreten. Und auch in den Schwämmen anderer Bearbeiter waren diese Komponenten abwesend oder nur mit relativ geringen Anteilen vorhanden (DASGUPTA *et al.*, 1984; GILLAN *et al.*, 1988; BARNATHAN *et al.*, 1992; CHRISTIE *et al.*, 1992; DUQUE *et al.*, 1993; CARBALLEIRA *et al.*, 1998b).

In dieser Hinsicht ist das Hervortreten der *ai*-C<sub>18:0</sub> in einigen der untersuchten Demospongiae (wie z.B. *D*-unknown sp. 1 und 2, *Axinella infundibuliformis* und *D*-unknown sp. 3) und in einigen Hexactinellida besonders bemerkenswert. Da ein Organismus, der selektiv hohe Gehalte der *ai*-C<sub>18:0</sub> synthetisiert, zur Zeit nicht bekannt ist, kann vermutet werden, dass es sich bei den Produzenten um sehr spezifische SAB handelt.

### 5.1.5 Mittkettig methylverzweigte Fettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

Spezifische Isomere mittkettig methylverzweigter FA sind von verschiedenen Bakterienphyla bekannt. Während hohe Gehalte der 10-Me-C<sub>16:0</sub> in mehreren Spezies der  $\delta$ -Proteobakterien-Gattung *Desulfobacter* (TAYLOR und PARKES, 1983; DOWLING *et al.*, 1988; KOHRING *et al.*, 1994) festgestellt wurden, findet sich in verschiedenen Arten der Actinobacteria 10-Me-C<sub>18:0</sub> (Tuberkulostearinsäure) in deutlichen Konzentrationen (CAMPBELL und NAWORAL, 1969; LARSSON *et al.*, 1980; TORKKO *et al.*, 1998; NIEPEL, 1999). In geringeren Konzentrationen können in diesen Organismen auch an C-10 methylierte FA anderer Kettenlänge wie z.B. die 10-Me-C<sub>16:0</sub> und 10-Me-C<sub>17:0</sub> vorkommen (EMBLEY *et al.*, 1987). LIPSKI *et al.* (2001) beschrieben 11-Me-C<sub>16:0</sub>, 10-Me-C<sub>17:0</sub> und 10-Me-C<sub>18:0</sub> des  $\beta$ -Proteobakteriums *Nitrospira moscoviensis*. Die Ergebnisse in Kapitel 4 zeigen weiterhin, dass an der Position 10 methylierte FA in geringen Konzentrationen auch von Alteromonadales-Angehörigen ( $\gamma$ -Proteobacteria) synthetisiert werden.

Verschiedene Vertreter gesättigter und einfach ungesättigter mcb-SCFA mit Kettenlängen zwischen C<sub>15</sub> und C<sub>19</sub> treten in allen Poriferen auf. Hier nehmen sie prozentuale Anteile zwischen 1,3 und 51,9 (Demospongiae) bzw. 2,2 und 46,3 (Hexactinellida) an den SCFA ein. Bis zu 3 Strukturisomere einer mcb-FA wurden in den Schwämmen beobachtet. In bakterienreichen Schwämmen sind die 10-, 11- und 12-Methyl-C<sub>18:0</sub> Hauptkomponenten, von denen das an C-11 verzweigte Isomer quantitativ hervortritt (vgl. Tabelle 5.9). Die strukturelle Charakterisierung der Konstitutionsisomere erfolgte anhand ihrer relativen GC-Retentionszeiten und diagnostischer Fragmentverteilungen (RYHAGE und STENHAGEN, 1960; THIEL *et al.*, 1999a).

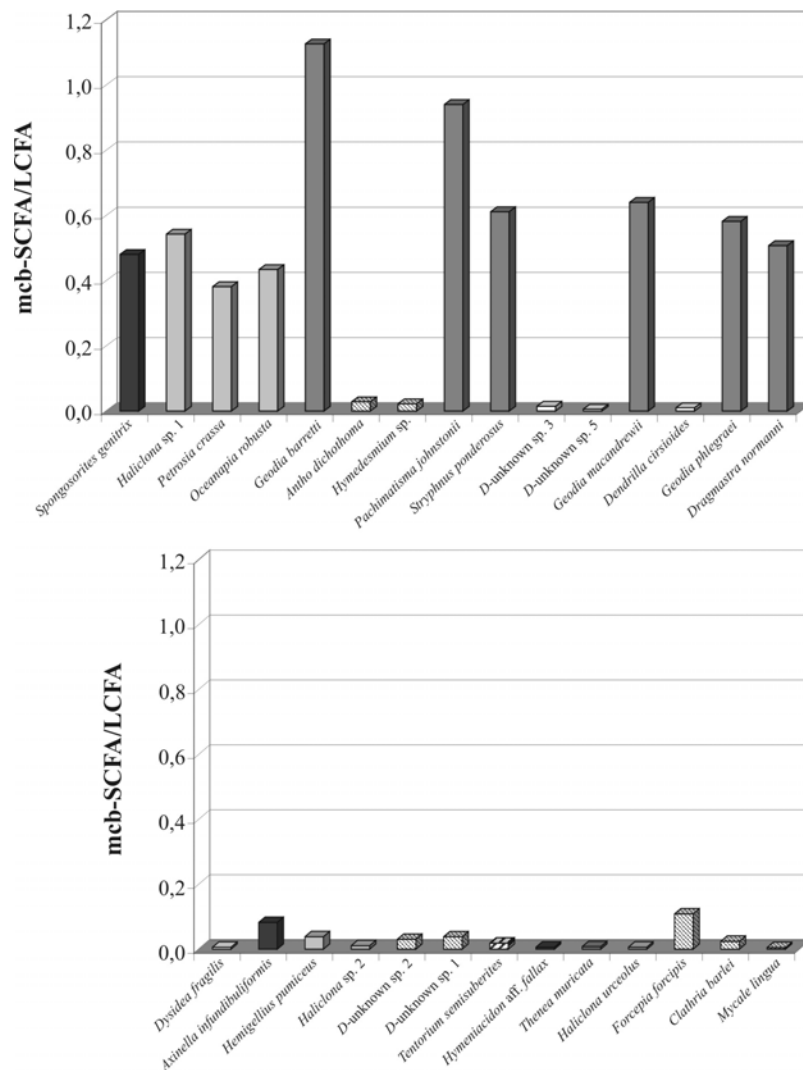
In vielen Fällen sind die Isomerengemische von mcb-SCFA mit ungeradzahligen Ketten quantitativ stärker als ihre geradzahligen Strukturhomologe vertreten. Da die Synthese von Isomerengemischen methylverzweigter FA in isolierten Bakterien noch nicht beobachtet wurde, sind



## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

deren Produzenten – Schwamm oder SAB – unklar. Hinweise auf bakterielle Quellen dieser Verbindungen ergeben sich aus der Beziehung zwischen dem Anteil potenziell bakterieller FA und dem Verhältnis mittkettig methylverzweigter SCFA zu LCFA, der in Abb. 5.8 gezeigt ist.

Anhand des Auftretens mittkettig methylverzweigter SCFA können die Poriferen gruppiert werden. Eine Gruppe umfasst Vertreter der Astrophorida-Familien Ancorinidae und Geodiidae und besitzt vergleichsweise hohe mcb-SCFA/LCFA-Werte ( $> 0,50$ ). Für *G. barretti* wurden beispielsweise für die mcb-SCFA höhere Konzentrationen als für LCFA gemessen ( $r = 1,13$ ). Für eine zweite Gruppe, die sich aus Angehörigen der Haplosclerida und Halichondrida zusammensetzt, wurden mcb-SCFA/LCFA-Werte zwischen 0,38 und 0,54 bestimmt. Alle Spezies, die hinsichtlich des Anteils der SCFA am FA-Inventar zu den bakterienarmen Schwämmen gerechnet wurden, zeichnen sich durch mcb-SCFA/LCFA-Werte  $\leq 0,11$  aus. Bemerkenswert ist des Weiteren, dass auch vereinzelte Poriferen mit hohem SCFA-Anteil lediglich geringe Gehalte der mcb-SCFA besitzen. Im Allgemeinen legt aber die Beobachtung hoher Gehalte der mcb-SCFA in Spezies mit hohem Anteil der SCFA die Vermutung nahe, dass die Isomerenmischungen der mcb-SCFA in den bearbeiteten Poriferen Bakterien entstammen.



**Abbildung 5.8** Mengenverhältnisse mittkettig methylverzweigter SCFA/LCFA in Demospongiae (Legende s. Abb. 5.5).

Die Annahme von Bakterien als Produzenten kurzkettiger mcb-FA wird durch die Ergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen an Exemplaren ausgewählter Schwammtaxa unterstützt. In Tabelle 5.2 sind die prozentualen Anteile der mcb-Octadecansäuren am SCFA-Inventar sowie für ausgewählte Schwämme geschätzte Dichten an Bakterienzellen im Mesohyl aufgeführt.

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

**Tabelle 5.2** Gehalte der mittkettig methylverzweigten Octadecansäure und geschätzte Bakteriendichte in den Poriferen.

Sub-Klasse	Ordnung	Spezies	Anteil mcb-C <sub>18:0</sub> an SCFA [%]	Bakteriendichte *)	Bakterielle Zellzahlen [g <sup>-1</sup> Gewebe nass] **)	
Hexactino.	Lyssacosida	<i>Sympagella</i> sp. nov.	16,1			
		<i>Ipheton panicea</i>	14,0			
Amphidisco.	Hyalonematidae	<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	41,4			
Homo-sclero	Homo-sclerophorida	<i>Plakortis simplex</i>	n.b.	+++	1 x 10 <sup>12</sup> ; S	
Tetractinomorpha	Astrophorida	<i>Stryphnus ponderosus</i>	23,6			
		<i>Dragmastra normanii</i>	24,0			
		<i>Geodia macandrewii</i>	24,4	+++		
		<i>Isops phlegraei</i>	26,4	+++	7 x 10 <sup>11</sup> ; K	
		<i>Geodia barretti</i>	26,7	+++	5 x 10 <sup>11</sup> ; K	
		<i>Pachymatisma</i>	21,6			
	<i>Thenea</i> sp.	0,8	++	1 x 10 <sup>10</sup> ; S		
	Hadromerida	<i>Tentorium semisuberites</i>	0,8			
Ceraclinomorpha	Poecilosclerida	<i>Antho dichotoma</i>	0,8			
		<i>Clathria barleii</i>	2,8			
		<i>Hymedesmium</i> sp.	5,2			
		<i>D-unknown</i> sp. 1	8,3			
		<i>D-unknown</i> sp. 2	4,0			
		<i>Forcepia forcipis</i>	3,7			
			<i>Mycale lingua</i>	3,8	+	2 x 10 <sup>10</sup> ; S
	Haplosclerida	<i>Oceanapia robusta</i>	28,1	+++	2 x 10 <sup>12</sup> ; S	
		<i>Haliclona</i> sp. 1	24,6	+++	4 x 10 <sup>12</sup> ; S	
		<i>Haliclona</i> sp. 2	1,0	+		
		<i>Haliclona urceolus</i>	1,0			
		<i>Petrosia crassa</i>	23,2			
		<i>Hemigellius pumiceus</i>	2,4	++		
	Halichondrida	<i>Phakellia ventilabrum</i>	n.b.	++	1 x 10 <sup>11</sup> ; K	
		<i>Phakellia robusta</i>	0,3			
		<i>Phakellia rugosa</i>	n.b.			
		<i>Axinella</i>	7,5			
		<i>Spongosorites genitrix</i>	16,9			
		<i>Hymeniacion aff. fallax</i>	4,9			
	Dendroceratida	<i>Dendrilla cirsioides</i>	4,1			
<i>D-unknown</i> sp. 3		4,0				
<i>D-unknown</i> sp. 4		2,9				
<i>D-unknown</i> sp. 5		1,2				

n.b. = nicht bestimmt; keine Angaben = nicht untersucht; \*) basierend auf optischen Abschätzungen von *F. Hoffmann* an Gewebeschnitten, +++/+ = hohe bzw. geringe Dichte; \*\*) vorläufige Berechnungen basierend auf Zählungen nach Homogenisierung, Membranfiltration und DAPI-Färbungen durch Mitglieder der AG Szewzyk. Die Analyse der SCFA und der Bakteriendichte erfolgte an Exemplaren des Sula-Rückens (S); Zellzählungen wurden an Schwämmen des Sula-Rückens (S) und des Korsfjordes (K) durchgeführt.

Mittkettig methylverzweigte SCFA treten in hohen Gehalten in Poriferen mit hoher Bakteriendichte, wie den meisten Astrophorida und einigen Haplosclerida, auf. Im Gegensatz dazu werden in bakterienarmen Poriferen relativ geringe Konzentrationen der mcb-FA aufgefunden. Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass mcb-SCFA in den untersuchten Kaltwasserporiferen bakteriellen Endobionten entstammen. Die erzielten Ergebnisse werden gemeinsam mit den Befunden zur Ökologie der Bakterien in *Geodia*-Spezies in Kapitel 5.5 diskutiert.

### 5.1.6 Cyclopropylfettsäuren

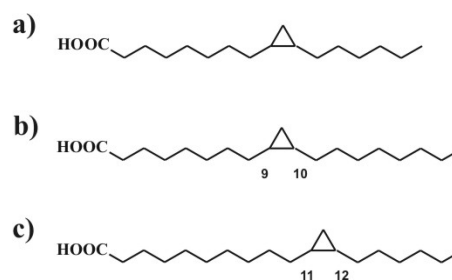
#### Einführung und Ergebnisse

Cyclopropyl-substituierte SCFA (cy-SCFA) sind Markerverbindungen Gram-positiver und -negativer Bakterien diverser phylogenetischer Zugehörigkeit unterschiedlicher O<sub>2</sub>-Toleranz (GROGAN und CRONAN, 1997 und darin genannte Referenzen). Neben diesen sind auch verschiedene Eukaryota wie z.B. einige Protisten (LONG und COE, 1976) als Produzenten von Cyclopropyl-FA bekannt. Poriferen scheinen dagegen diese Komponenten nicht zu synthetisieren. In Bakterien sind die in Abb. 5.9 dargestellten cy-SCFA am häufigsten vertreten.

Wie die Ergebnisse von Laborstudien an Bakterienisolaten zeigten, führt allgemein die Transmethylierung von *cis*-mono-en-SCFA (hier C<sub>16:1</sub>Δ<sup>9c</sup>, C<sub>18:1</sub>Δ<sup>9c</sup> bzw. C<sub>18:1</sub>Δ<sup>11c</sup>) zur Biosynthese von cy-SCFA (POLACHEK *et al.*, 1966). Eine verstärkte Umsetzung der Vorläuferverbindungen zu Cyclopropylcarbonsäuren wurde als Reaktion auf zunehmenden Nährstoff- und Wassermangel beobachtet (KIEFT *et al.*, 1994). Die Funktion dieser Lipidbestandteile ist zur Zeit dennoch nicht geklärt. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass sich die physikalischen Eigenschaften von Lipiden, die entweder *cis*-mono-en-FA oder cy-FA beinhalten, sehr ähneln (Chapman *et al.* 1966).

Die MS-Fragmentierung von cy-FA zeigt gegenüber den mono-en-FA gleicher C-Anzahl ähnliche Merkmale. Die Substanzklassen können in den mit DMDS behandelten Fraktionen differenziert werden, da cy-FA nicht umgesetzt werden. Die Lokalisierung der Cyclopropyl-Teilstruktur erfolgt gemeinhin durch reduktive Ringspaltung mit H<sub>2</sub> und Vermessung der resultierenden gesättigten methylverzweigten FA (MCCLOSKEY und LAW, 1967). Aufgrund der Anwesenheit hoher Gehalte gesättigter mcb-SCFA in zahlreichen Poriferenspezies (s. Kapitel 5.1.5) wurde in dieser Arbeit die reduktive Umsetzung für diese Fragestellung nicht durchgeführt. Stattdessen wurde die Zuordnung der 9,10-Cyclopropylhexadecansäure (C<sub>17:0</sub>cyc<sub>9,10</sub>) und der 9,10-Cyclopropyloctadecansäure (C<sub>19:0</sub>cyc<sub>9,10</sub>) anhand ihrer relativen GC-Retentionszeiten (ECL = 16,82 bzw. 18,82 als ME), der Ergebnisse von Koelutionsexperimenten mit käuflichen Standardsubstanzen (Bacterial Acid Methyl Ester Mix, Supelco) und der Beobachtung underivatisierter FA nach DMDS-Behandlung vorgenommen.

Cy-FA wurden in zahlreichen Individuen der Hexactinellida und der Demospongiae in meist geringen Gehalten gemessen. In den Hexactinellida wurden für Cyclopropylcarbonsäuren Anteile



**Abbildung 5.9** Aus Bakterien bekannte Cyclopropylsäuren:  
 a) 9,10-Cyclopropylhexadecansäure,  
 b) 9,10-Cyclopropyloctadecansäure (Dihydrosterculinsäure) und  
 c) 11,12-Cyclopropyloctadecansäure (Lactobacillinsäure).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

---

von 1,2 bis 8,8 % gemessen, wobei höchste Gehalte mit 5,7 % für die  $C_{17:0\text{cyc}9,10}$  in *Hyalonema* sp. 2 gefunden wurden. In den Demospongiae wurden stärkere Schwankungsbreiten mit bis zu 18,8 % festgestellt. Höchste Anteile an den SCFA lagen in dieser Poriferenklassen mit 18,8 % für die  $C_{17:0\text{cyc}9,10}$  in *Haliclona* sp. 2 vor.

### Diskussion

Kurzkettige FA mit interner Cyclopropyl-Substitution treten als Lipidklasse in den Exemplaren in meist geringen Konzentrationen auf. Wie erwähnt sind diverse Bakterien und Eukaryoten bekannte Produzenten von cy-FA. Im Hinblick auf die Standorte der Schwämme sowie die weite Verbreitung von cy-SCFA unter den Bakterien (GROGAN und CRONAN, 1997) wird vermutet, dass die Komponenten hier die Anwesenheit von Bakterien markieren.

Ein allgemeiner Zusammenhang zwischen der Bakteriendichte eines Schwamms und des Auftretens von cy-SCFA wurde nicht festgestellt, wenngleich oftmals hohe Gehalte in vergleichsweise bakterienarmen Spezies beobachtet wurden. Da die Funktion der Cyclopropyl-FA für die Membraneigenschaften nicht geklärt sind, kann lediglich spekuliert werden, dass

- i) mögliche Produzenten an der Bakteriengemeinschaft in Schwämmen untergeordnet beteiligt sind, und/oder
- ii) unter den Standortbedingungen ein geringfügiger Bedarf zur Konversion der einfach ungesättigten Vorläufer-FA besteht.

### 5.1.7 3-Methylfettsäuren

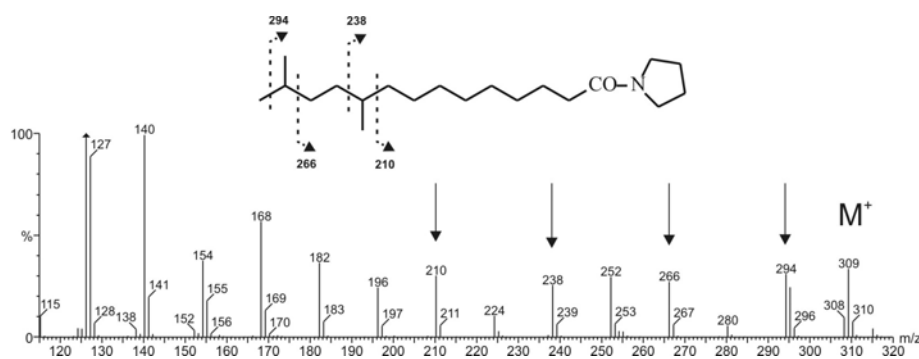
Infolge charakteristischer Spektren mit dominanten Fragmentionen  $m/z$  74 und 101 sind gering konzentrierte gesättigte Komponenten in manchen *Bakterienschwämmen*, wie z.B. einigen Geodiidae, *Oceanapia robusta*, *Petrosia crassa*, *Haliclona* sp. 1, *Spongosorites genitrix* und dem hexactinelliden *Hyalonema* (?) sp. 1, mit 15 und 16 C-Atomen (ECL 14,36 bzw. 15,36) auffallend. Die Fragmentierung der Komponenten deutet auf das Vorkommen einer Methylgruppe an C-3 hin, so dass hier die aus den Schwämmen *Plakortis halichondroides*, *Callyspongia fallax* sowie *Chondrosia reniformis* (CARBALLEIRA und SHALABI, 1990; CARBALLEIRA und PAGÁN, 2001; NECHEV *et al.*, 2002) bekannten 3-Methyltetradecansäure und 3-Methylpentadecansäure festgestellt wurden.

Hinsichtlich ihrer C-Anzahl und dem bevorzugten Auftreten in *Bakterienschwämmen* wird eine bakteriogene Herkunft der 3-Methyl-SCFA vermutet.

### 5.1.8 Dimethylfettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

In einigen Demospongiae und Hexactinellida sind gesättigte SCFA in niedrigen Konzentrationen (bis 2 % der SCFA) aufgrund ihrer sehr geringen relativen Retentionszeit auffallend. So wurden für C<sub>16</sub>- (M<sup>+</sup> = 270) und C<sub>17</sub>-Komponenten (M<sup>+</sup> = 284) ECL-Werte von 15,06 bzw. 16,05 festgestellt. Die MS-Fragmentierungen dieser Verbindungen ähneln denen der mcb-SCFA, bei denen ein signifikantes Fragmentation *m/z* 143 eine mittkettige Methylverzweigung anzeigt. Die erkennbar hervortretenden Fragmentationen *m/z* 167, 171/172 und 199, die indikativ für eine Methylverzweigung an C-10 sind, sowie ein signifikant erhöhtes Fragment *m/z* 227 (M<sup>+</sup> -43, *i*-Methylverzweigung) legen für die C<sub>16</sub>-Komponente aus *Haliclona* sp. 1 die Vermutung nahe, dass es sich um die 10,13-Dimethyltetradecansäure handelt. Diese Annahme wird durch die Fragmentierung des *N*-acyl-Pyrrolidids unterstützt. Abb. 5.10 zeigt, dass in diesem Spektrum die für die Positionen ω<sub>2</sub> und ω<sub>5</sub> charakteristischen Fragmente *m/z* 224 und 280 deutlich zurücktreten und jeweils von intensiveren Fragmenten mit 14 amu Abstand flankiert werden.



**Abbildung 5.10** Ausschnitt des MS-Spektrums (EI-M<sup>+</sup>, vierfache Vergrößerung) des *N*-acyl-Pyrrolidids und daraus abgeleitete Struktur (CARBALLEIRA und MALDONADO, 1989a).

Die Fragmentierungen der höhermolekularen Strukturverwandten in den untersuchten Schwämmen sind zwar nicht eindeutig, aber aufgrund äquivalenter Elutionsverhalten wird vermutet, dass ihre Methylverzweigungen ebenfalls an den Positionen ω<sub>2</sub> und ω<sub>5</sub> lokalisiert sind. In diesem Fall wäre mit der 11,14-Dimethyl-C<sub>15:0</sub> ein neuer Naturstoff in Schwämmen entdeckt worden.

#### Diskussion

Dimethylcarbonsäuren treten in der Natur selten auf, und verschiedene Strukturisomere sind in meist geringen Konzentrationen in mehreren Schwämmen gefunden worden (NECHEV *et al.*, 2002). Die 10,13-Dimethyltetradecansäure ist bereits als Phospholipidbestandteil zweier karibischer ceractinomorpher Schwämme bekannt (CARBALLEIRA und MALDONADO, 1989a; CARBALLEIRA und PAGAN, 2000). THIEL (1997) stellte unbestimmte Dimethylpentadecansäuren in relativ geringen Konzentrationen in den tetractinomorphen *Agelas oroides* und *Coralistes typus* fest. Unter den Bakterien wurden Träger zweifach methylverzweigter FA weit überwiegend in den Gram-positiven Gruppen, wie z.B. in einer *Bacillus*-Art (Firmicutes), sowie in verschiedenen *Mycobacterium*-Arten und *Saccharopolyspora*-Stämmen (beide zu den Actinobacteria) (EMBLEY *et al.*, 1987; CHOU *et al.*,

1996; CARBALLEIRA *et al.*, 2001) gefunden. *Thermomicrobium roseum* ist ein Gram-negativer Produzent dimethylierter FA (POND *et al.*, 1986). Hinsichtlich ihrer Kettenlängen kann angenommen werden, dass die gefundenen Dimethylcarbonsäuren Syntheseprodukte von Bakterien sind.

### 5.1.9 2-Methoxyfettsäuren

#### Einführung und Ergebnisse

Das Auftreten methoxylierter FA ist auf wenige Organismengruppen wie Rotalgen, Bakterien oder Schwämme beschränkt (BARNATHAN *et al.*, 1998; KORNPORST und BARNATHAN, 1998). Schwämme beinhalten als einzige Organismen 2-Methoxy-(bzw.  $\alpha$ -MeO-)FA; FA mit an anderen Positionen lokalisierten MeO-Gruppen sind dagegen bislang in Poriferen nicht gefunden worden. Wenngleich strukturell diverse  $\alpha$ -MeO-FA mit mehreren gesättigten und ungesättigten Komponenten mit 14 bis 28 C-Atomen von einigen Demospongiae-Exemplaren der Subklassen Tetractinomorpha und Ceractinomorpha beschrieben wurden, scheinen sie doch eine eher selten vorkommende Substanzklasse zu bilden (z.B. AYANOGLU *et al.*, 1983; CARBALLEIRA und PAGÁN, 2001). Allgemein wurden die  $\alpha$ -MeO-FA in Poriferen als Bestandteile der PLFA, vorwiegend der PE-Fraktion, mit individuellen Anteilen bis etwa 5 % festgestellt.

Der Nachweis der Produzenten von  $\alpha$ -MeO-FA in Schwammextrakten wurde noch nicht erbracht, und in neueren Arbeiten wird die bakterielle Synthese der kurzkettigen Homologe diskutiert. Hierbei wird aufgrund gleicher Kettenlänge und Position der Substituenten ein biosynthetischer Zusammenhang zu den von zahlreichen Bakterien bekannten  $\alpha$ -OH-FA in Erwägung gezogen (CARBALLEIRA und PAGÁN, 2001).

Die MS-Fragmentmuster von  $\alpha$ -MeO-CarbonsäureME sind durch ein charakteristisches Fragmentation  $m/z$  104 gekennzeichnet, das aus der gemeinsamen Abspaltung der Methylester- und der Methoxygruppe (McLafferty-Umlagerung,  $\text{CH}_2\text{OCH}_3\text{-CO}_2\text{-CH}_3$  ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3^+$ )) resultiert. Charakteristische Fragmentationen sind ferner  $[\text{M} - 32]^+$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $[\text{M} - 59]^+$  ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) sowie  $[\text{M} - 91]^+$  ( $\text{M}^+ - [\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO}_2\text{CH}_3]$ ).

Kurzkettige  $\alpha$ -MeO-FA wahrscheinlich bakterieller Herkunft wurden in beiden untersuchten Poriferenklassen beobachtet. Am häufigsten vertreten ist eine  $\alpha$ -MeO-Hexadecensäure ( $\text{M}^+ = 298$ ; ECL = 16,89), die in einigen poeciloscleriden Schwämmen, wie *Hymedesmium* sp., *D-unknown* sp. 2 und *Antho dichothoma*, mit Anteilen bis 2,2 % beobachtet wurde. In dem haploscleriden *Oceanapia robusta*, in dem diese Komponente nicht vorhanden ist, wurde eine  $\alpha$ -MeO-Octadecadiensäure in vergleichsweise hohen Konzentrationen (7,1 %) beobachtet. Neben dem charakteristischen Fragmentmuster, das das in geringer Intensität vertretene Molekularion ( $\text{M}^+ = 324$ ) sowie  $m/z$  292, 265 und 233 umfasst, deutet auch der ECL-Wert von 18,63 auf eine zweifache Untersättigung dieser Komponente hin. Ein gesättigter kurzkettiger Vertreter wurde mit der  $\alpha$ -MeO-Hexadecensäure ( $\text{M}^+ = 300$ ; ECL = 17,25) in dem hexasterophoriden *Farrea* (?) sp. bestimmt (Abb. 5.11).

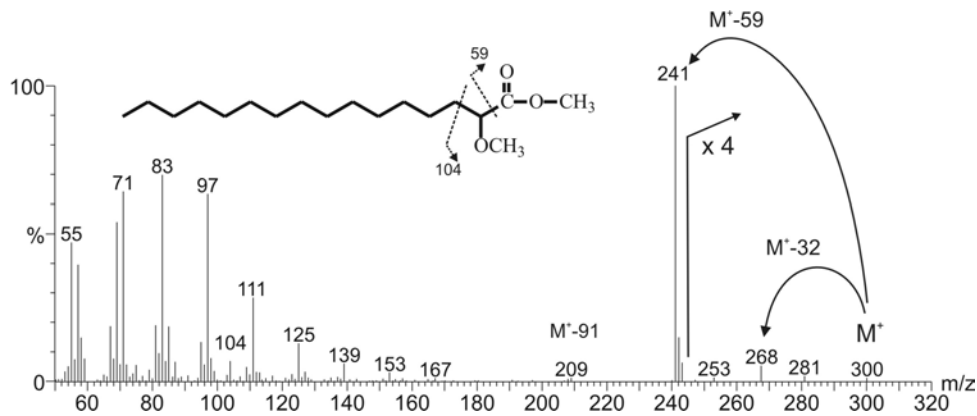


Abbildung 5.11 Strukturformel und MS-Fragmentierung ( $\text{EI}^+$ ) des  $\alpha$ -MeO-HexadecansäureME aus *Farrea* (?) sp.

### Diskussion

In den untersuchten Poriferen treten kurzkettige  $\alpha$ -Methoxycarbonsäuren mit einer Ausnahme in Spezies auf, die über moderate bis hohe Gehalte an weiteren Bakteriencarbonsäuren verfügen. Vertreten sind dabei sowohl in der Literatur bekannte (CARBALLEIRA *et al.*, 1992; CARBALLEIRA und SEPULVEDA, 1992; CARBALLEIRA *et al.*, 1998a; KORNPROBST und BARNATHAN, 1998; CARBALLEIRA und PAGÁN, 2001) als auch neue Verbindungen dieser Substanzklasse, von denen insbesondere die noch unbeschriebene und relativ hoch konzentrierte  $\alpha$ -MeO-Octadecadiensäure in *Oceanapia* sp. nennenswert ist.

Als Bestandteil von Phospholipiden wurden  $\alpha$ -MeO-SCFA aus Schwämmen in den Studien anderer Bearbeiter vorwiegend in der in Bakterien stark vertretenen Phosphatidylethanolamin-Fraktion lokalisiert (CARBALLEIRA und SEPULVEDA, 1992). Und auch in den bearbeiteten Schwämmen gibt die auf *Bacteriosponges* begrenzte Verteilung der  $\alpha$ -MeO-SCFA Grund zu der Annahme, dass diese von bislang unbekanntem SAB synthetisiert werden. Da allerdings  $\alpha$ -MeO-FA in vielen weiteren bakterienreichen Individuen fehlen, sind sie als Indikator für den Bakteriengehalt eines Schwammes ungeeignet.

## 5.2 Langkettige Dicarbonsäuren

### Einführung

Dicarbonsäuren (engl. dioic acids, DCA) finden sich sehr selten in der Natur, und Berichte aus fossilen und rezenten Proben sind spärlich. So ist diese Lipidklasse aus Schwämmen bis jetzt unbekannt. Das Auftreten von  $\alpha,\omega$ -DCA in fossilen und subfossilen Depositionen wurde z.B. für tertiäre Tonschiefer und Braunkohlen sowie für marine und lakustrine Sedimente beschrieben (DOUGLAS *et al.*, 1971; PERRY *et al.*, 1979; VOLKMAN *et al.*, 1980; GILLAN und HOGG, 1984; CHAFFEE und JOHNS, 1985; SHAW und JOHNS, 1985; GOOSSENS *et al.*, 1989; WAKEHAM, 1999).

Rezent sind Serien von  $\alpha,\omega$ -DCA, in denen geradzählige Homologe dominieren, in wenigen Pflanzenspezies, wie *Equisetum* sp. (Schachtelhalm), *Quercus suber* (Korkeiche), *Betula pendula* (Silberbirke), und verschiedenen Seegrassgattungen (HOLLOWAY, 1972; KOLATTUKUDY *et al.*, 1975;

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

NICHOLS *et al.*, 1982; REZANKA, 1998) vorhanden. In diesen liegen sie, wie in den Sporen von Schachtelhalmen, entweder frei vor oder bilden Teilstrukturen der Biopolymere Suberin und Kutin. Vorkommen geradzahligter DCA in Sedimenten werden aus diesem Grund meist auf Pflanzeneinträge zurückgeführt.

Auch unter den Mikroorganismen ist das Vorkommen von DCA auf wenige Taxa begrenzt. Es wurden diese Komponenten bis jetzt in einer Cyanobakteriengattung (DEMBITSKY *et al.*, 2001) sowie in wenigen weiteren Bakterienspezies festgestellt. Der einzige Bericht über DCA in einem Archaeon, *Pyrococcus furiosus* (CARBALLEIRA *et al.*, 1997b), blieb bis jetzt unbestätigt.

Die bakterielle Synthese von  $\alpha,\omega$ -DCA scheint mit Ausnahme der Cyanobacteria auf anaerobe Organismen beschränkt zu sein. Langkettige ( $C_{29}$  bis  $C_{34}$ ), mittkettig mono- oder dimethylverzweigte Isomere wurden in signifikanten Konzentrationen im hyperthermophilen Fermentierer *Thermotoga maritima* (HUBER *et al.*, 1986; DE ROSA *et al.*, 1988; CARBALLEIRA *et al.*, 1997b) und in dem thermophilen *Thermoanaerobacter* (syn. *Clostridium*) *ethanolicus* (JUNG *et al.*, 1994) beobachtet. Weiterhin wurde diese Verbindungsklasse in den thermophilen Clostridien *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricum* und *Thermoanaerobacter thermosulfurogenes* festgestellt (LANGWORTHY und POND, 1986b).

Mesophile Träger langkettiger  $\alpha,\omega$ -DCA sind ebenfalls unter den Clostridien zu finden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um den Fermentierer *Sarcina ventriculi* (JUNG *et al.*, 1993), einem unbestimmten Angehörigen der Sulfatreduzierergattung *Desulfotomaculum* (REZANKA *et al.*, 1990) und die im Wiederkäuer(Ruminantia)-Pansen lebenden *Butyrivibrio* sp. (KLEIN *et al.*, 1979). Im auxotrophen *Butyrivibrio* sp., das nicht zur *de-novo*-Synthese von Carbonsäuren befähigt ist, wurde 15,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure als ein Hauptbestandteil der transveresterten Lipidfraktion nachgewiesen (HAUSER *et al.*, 1979). In den untersuchten SAB-Isolaten der Proteobacteria und Firmicutes (Klasse Bacilli) wurden diese Komponenten nicht beobachtet.

DCA sind strukturell gesehen Dimerisationsprodukte zweier kurzkettiger mono-FA. In der Tat zeigten biosynthetische Studien mit  $^{14}C$ -markierter bzw. deuterierter *n*-Hexadecansäure an *Butyrivibrio* spp., dass die bakterielle Synthese der 15,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure (Abb. 5.12) auf die reduktive Kondensation zweier Moleküle der als einziges Substrat eingesetzten Monocarbonsäure zurückzuführen ist (HAUSER *et al.*, 1979; HAZLEWOOD und DAWSON, 1979; FITZ und ARIGONI, 1992). Das Substrat wird hierbei vollständig in die Lipidbestandteile der Zellmembran inkorporiert (HAUSER *et al.*, 1979).

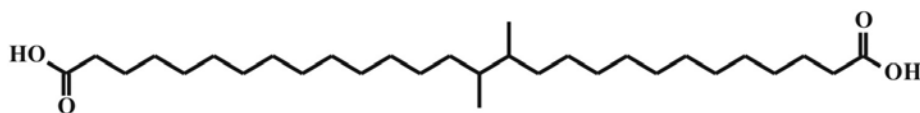


Abbildung 5.12 Strukturformel der 15,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure.

Wie Abb. 5.12 zeigt, führt die C-C-Kopplung zwischen den Atomen an  $\omega 2$  der *n*-Hexadecansäuremoleküle zur Bildung einer DCA mit kettenzentraler, *vicinaler* Dimethylverzweigung, nämlich der 15,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure. Aufgrund ihrer für FettsäureME ungewöhnlichen MS-Fragmentierung (s.u.) wurde von KLEIN *et al.* (1979) für diese Substanz der Trivialname



*diabolic acid* vorgeschlagen, der anschließend auf alle Angehörigen der Verbindungsklasse der vic-dimethyl-DCA übertragen wurde.

Die C-C-Kopplung an den terminalen C-Atomen ( $\omega$ 1) führt dagegen zu linearen, monomethylverzweigten oder nicht *vicinal* dimethylverzweigten  $\alpha,\omega$ -DCA, wie z.B. der aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* bekannten 13,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure (JUNG *et al.*, 1994) aus zwei *iso*-Pentadecansäuremolekülen (Abb. 5.13).

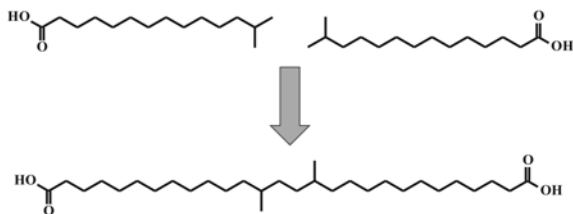


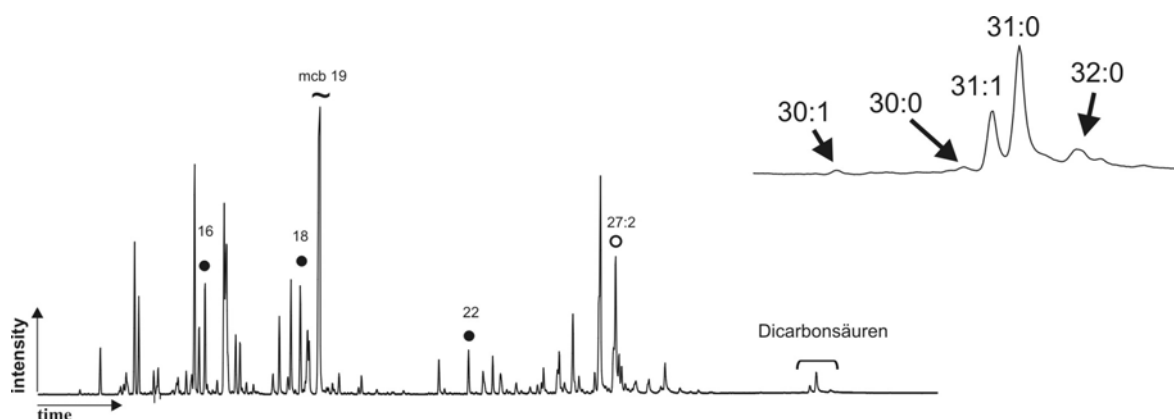
Abbildung 5.13 Strukturformeln der *i*-Pentadecansäure und der 13,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure.

Aufgrund der vorher genannten biosynthetischen Mechanismen können bakteriogene Dimethyl-DCA grundsätzlich anhand der Positionen ihrer Verzweigungen gruppiert werden. Mehrere Arbeiten beschäftigten sich mit der Funktion von  $\alpha,\omega$ -DCA in Bakterien. Es wurde gezeigt, dass die Komponenten weit überwiegend in gebundener Form als Bestandteile komplexer Lipidmoleküle der Zellmembran vorliegen. So sind zum Beispiel für *Butyrivibrio* sp. in Phospho-, Phosphoglyco- und Glycolipiden veresterte 15,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäuren beschrieben (CLARKE *et al.*, 1980; HAZLEWOOD *et al.*, 1980).

Es ist bekannt, dass langkettige  $\alpha,\omega$ -DCA aus der Bindung von Monocarbonsäuren beider Lagen der Lipiddoppelschicht gebildet werden (Bildung eines Diglycerids) und als membranspannende Moleküle die interne Stabilität der Zellmembran signifikant erhöhen (CLARKE *et al.*, 1980; JUNG und HOLLINGSWORTH, 1994; BURDETTE *et al.*, 2002). Stimulierungsversuche an *S. ventriculi* ergaben, dass Änderungen der Kulturbedingungen (pH, Temperatur) die Synthese langkettiger DCA drastisch fördern (JUNG *et al.*, 1993). HAUSER *et al.* (1979) zeigten darüber hinaus, dass die Anwesenheit von Dimethylverzweigungen die Fluiditätseigenschaften der Membran ebenfalls erheblich beeinflusst. Im Allgemeinen kann also der Schluss gezogen werden, dass langkettige Dimethyl-DCA zur Bewahrung der Stabilität und Viskosität der Zellmembranen bestimmter thermophiler und mesophiler anaerober Spezies der Thermotogae und Clostridia eingesetzt werden.

### Ergebnisse

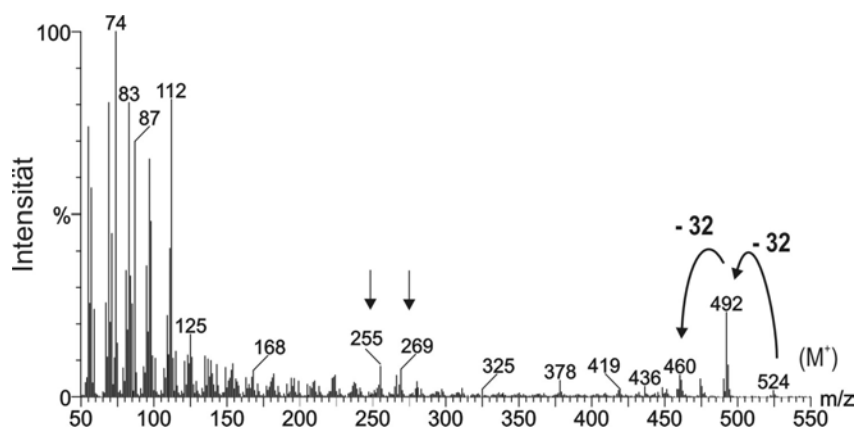
In den in dieser Arbeit untersuchten Poriferen wurden gesättigte und einfach ungesättigte langkettige  $\alpha,\omega$ -DCA mit 30 bis 32 C-Atomen in einigen Angehörigen der Demospongiae und der Hyalonematidae (Hexactinellida) gefunden. In diesen wurden fünf Vertreter der Substanzklasse als ihre Dimethylester-Derivate in den FAME-Fractionen des methylierten Gesamthydrolysats, in denen sie üblicherweise Anteile bis zu zwei Gew.-Prozent der Fraktion einnehmen, festgestellt. Die Komponenten wurden anhand ihres GC-Retentionsverhaltens und typischer Fragmentverteilungen im Vergleich mit Literaturdaten identifiziert (VÍDEN und REZANKA, 1987; JUNG *et al.*, 1993; JUNG *et al.*, 1994). In allen Schwämmen mit langkettigen  $\alpha,\omega$ -DCA wurden die gleichen Komponenten in signifikant ähnlichen Verteilungsmustern beobachtet (Abb. 5.14).



**Abbildung 5.14** Partielles Gaschromatogramm der FAME aus *Geodia barretti* (• = gesättigte und ○ = ungesättigte Komponenten).

Als prägnante Fragmentationen gesättigter FAME treten die aus der McLafferty-Umlagerung resultierenden  $m/z$  74 und 87 sowie  $m/z$  98 als allgemeiner Basispeak von Dimethylestern auf (VÍDEN und REZANKA, 1987; CARBALLEIRA *et al.*, 1997b; REZANKA, 1998). Diagnostische Fragmentationen sind des Weiteren  $[M - 31]^+$  ( $\text{CH}_3\text{O}$ ),  $[M - 32]^+$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) und  $[M - 64]^+$  ( $\text{M}^+ - [\text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3\text{OH}]$ ), während das Molekularion üblicherweise nur mit geringen Intensitäten vertreten ist.

Das Massenspektrum der Hauptkomponente dieser Lipidklasse im Probenmaterial ist in Abb. 5.15 dargestellt. In dem Spektrum dieser Verbindung sind die Fragmentationen  $m/z$  55, 74, 98 und 112 sowie  $[M - 32]^+$  und  $[M - 64]^+$  hervortretend, die in diesen Fall einer  $\text{C}_{31}$ -DCA korrespondieren (REZANKA, 1998).



**Abbildung 5.15** MS-Fragmentierung ( $\text{EI}^+$ ) der  $\text{C}_{31:0}$ -Dicarbonsäure (als DiME).

Basierend auf dem Auftreten indikativer Fragmentionen wie des  $[M - 32]^+$ , wurden die weiteren  $\alpha,\omega$ -DCA als  $\text{C}_{30:1}$ ,  $\text{C}_{30:0}$ ,  $\text{C}_{31:1}$  und  $\text{C}_{32:0}$  identifiziert. Neben den genannten Fragmentionen treten sowohl in der Hauptkomponente als auch in der gesättigten  $\text{C}_{32}$ -DCA die Fragmente  $m/z$  255 und 269 bzw.  $m/z$  269 hervor, die auf bevorzugte Fragmentierungen im zentralen Bereich der Ketten hinweisen. Im Vergleich mit der Struktur bekannter natürlicher langkettiger Carbonsäuren kann dieses Fragmentmuster mit der Präsenz von Methylverzweigungen – entweder *vicinal* oder durch drei

C-Einheiten distanziert – erklärt werden (KLEIN *et al.*, 1979; JUNG *et al.*, 1994). Weiterhin sind für die C<sub>31:0</sub>-DCA die Fragmentionen *m/z* 237 (*m/z* 269 -MeOH), *m/z* 224 (*m/z* 255 -MeO) und die Fragmentionen *m/z* 297 und 266 (hier indikativ für Verzweigung an C-16) leicht erhöht (Abb. 5.16).

Weniger deutlich sind Fragmentionen, die die Position der weiteren Methylverzweigung anzeigen. Hierbei können in Bezug auf bekannte bakterielle DCA und ihre MS-Fragmentierungsmechanismen Verzweigungen an C-13 oder C-15 angenommen werden. Aufgrund einer erhöhten Intensität von *m/z* 311 und 280 (diagnostisch für Verzweigung an C-13) im Vergleich mit den aus einer Methylverzweigung an C-15 resultierenden Fragmenten *m/z* 283 und 252 wird angenommen, dass es sich bei der Hauptkomponenten dieser Lipidklasse in Schwämmen um die 13,16-Dimethyl-1,31-dicarbonsäure handelt (Abb. 5.17).

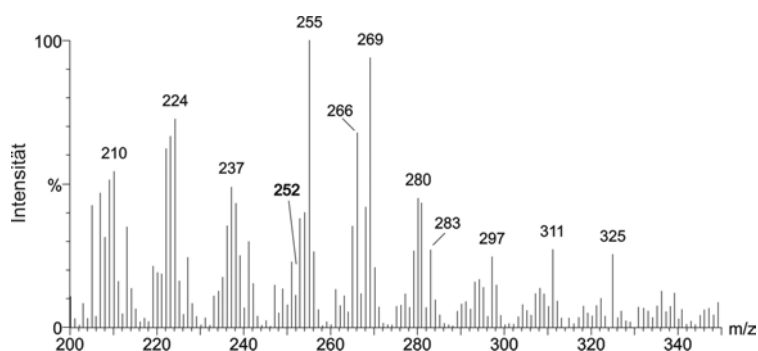


Abbildung 5.16 Fragmentmuster (EI<sup>+</sup>) der C<sub>31:0</sub>-Dicarbonsäure (als DiME) im Scan-Bereich 200 bis 350 amu.

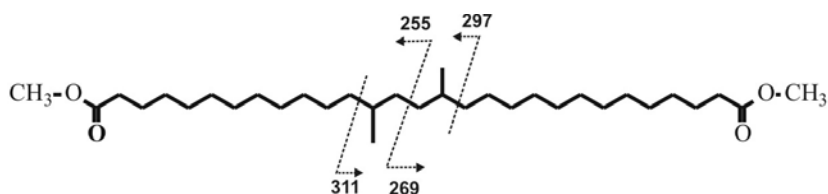


Abbildung 5.17 Strukturformel und Fragmentierungsschema des 13,16-Dimethyl-1,31-dicarbonsäureDiME.

Analog zu diesen Überlegungen wird für die C<sub>32:0</sub>-Komponente vermutet, dass hier die 13,16-Dimethyl-1,32-dicarbonsäure gefunden wurde. Die Position der Doppelbindungen in den ungesättigten Dicarbonsäuren C<sub>30:1</sub> und C<sub>31:1</sub> wurde nicht bestimmt. Das Vorkommen der in den Schwämmen hervortretenden DCA 13,16-Dimethylnonacosan-1,31-dicarbonsäure und 13,16-Dimethyltriacosan-1,32-dicarbonsäure in den Demospongiae ist in Tabelle 5.3 dargestellt.

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

**Tabelle 5.3** Auftreten langkettiger  $\alpha,\omega$ -DCA in Demospongiae.

Subklasse	Ordnung	Spezies	Dicarbonsäuren	
<b>Homoscleromorpha</b>	Homosclerophorida	<i>Plakortis simplex</i>	●	
<b>Tetractinomorpha</b>	Astrophorida	<i>Stryphnus ponderosus</i>	●	
		<i>Dragmastra normanii</i>	●	
		<i>Geodia barretti</i>	●	
		<i>Geodia macandrewii</i>	●	
		<i>Isops phlegraei</i>	●	
		<i>Pachymatisma johnstonii</i>	○	
		<i>Thenea muricata</i>		
	Hadromerida	<i>Tentorium semisuberites</i>		
	<b>Ceractinomorpha</b>	Poecilosclerida	<i>Antho dichotoma</i>	
			<i>Clathria barleii</i>	
<i>Hymedesmium</i> sp.				
<i>D</i> -unknown sp. 1				
<i>D</i> -unknown sp. 2				
<i>Forcepia forcipis</i>				
<i>Mycale massa</i>				
Haplosclerida		<i>Oceanapia robusta</i>	●	
		<i>Haliclona</i> sp. 1	●	
		<i>Haliclona</i> sp. 2		
		<i>Haliclona urceolus</i>		
		<i>Petrosia crassa</i>	●	
		<i>Hemigellius pumiceus</i>		
Halichondrida		<i>Phakellia ventilabrum</i>		
		<i>Phakellia robusta</i>		
		<i>Axinella rugosa</i>		
		<i>Axinella infundibuliformis</i>		
		<i>Spongosorites genitrix</i>	●	
		<i>Hymeniacidon</i> aff. <i>fallax</i>		
Dendroceratida		<i>Dendrilla cirsioides</i>		
	<i>D</i> -unknown sp. 3			
	<i>D</i> -unknown sp. 4			
	<i>D</i> -unknown sp. 5			

● = rel. hohe Konzentration; ○ = in Spuren; kein Eintrag = nicht nachgewiesen

Langkettige  $\alpha,\omega$ -DCA treten in zwölf Demospongiae unabhängig von ihrer phylogenetischen Position auf. Wie in Tabelle 5.1 dargestellt, handelt es sich hierbei um Arten, die ebenfalls über relativ hohe Gehalte an kurzkettigen FA und insbesondere an den mcb-SCFA verfügen und daher den bakterienreichen Schwämmen zugeordnet worden sind. In den Hexactinellida sind DCA lediglich in zwei Angehörigen der Hyalonematidae beobachtet worden. In diesen wurden die aus den Demospongiae bekannten Verbindungen in *Hyalonema* (?) sp. 1 sowie kurzkettige (C<sub>11</sub> bis C<sub>13</sub>) DCA in *H*-unknown sp. 9 festgestellt.

Für den Demospongiae *G. barretti* wurden die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der C<sub>31:1</sub>- und C<sub>31:0</sub>-DCA mit -21,2 bzw. -20,1 [‰] gemessen. Im Vergleich mit den C-Isotopensignaturen von Bakterien-SCFA in diesem Schwamm, wie z.B. *i*- und *ai*-C<sub>15:0</sub> (s. Kapitel 5.5.2.2), zeichnen sich langkettige DCA durch deutlich leichtere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aus (~ 3,9 ‰).

### Diskussion

Das Vorkommen estergebundener dimethylverzweigter  $\alpha,\omega$ -DCA mit 30 bis 32 C-Atomen in Kaltwasser-Demospongiae ist aufgrund ihres ansonsten in der Natur sehr begrenzten Auftretens von großem Interesse. Unter Berücksichtigung der Standorte der Schwämme, bekannter Produzenten langkettiger  $\alpha,\omega$ -DCA – Plantae und Bacteria – sowie der in diesen Taxa vertretenen Strukturen ist die bakterielle Herkunft der DCA in Poriferen sehr wahrscheinlich. Diese Annahme wird durch die Beobachtung der Komponenten ausnahmslos in bakterienreichen Poriferen, die diverse weitere Bakterienmarker, wie z.B. Hopanoide oder mcb-SCFA, in teilweise signifikanten Konzentrationen beinhalten, unterstützt. Vor diesem Hintergrund erscheint das Auftreten langkettiger DCA in einem hexactinelliden Schwamm, in dem andere Bakterienlipide ebenfalls in hohen Gehalten auftreten, nicht als ungewöhnlich. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DCA und der phylogenetischen Position der Poriferen ist nicht erkennbar. Aus diesem Grund wird vermutet, dass mit den langkettigen DCA neue Bioindikatoren für spezielle Bakterien, die mit den untersuchten *Bakterienschwämmen* assoziiert sind, gefunden wurden.

Bis jetzt ist die Befähigung zur Synthese langkettiger  $\alpha,\omega$ -DCA in Bakterien ausschließlich in wenigen Angehörigen der Thermotogales und der Clostridiales festgestellt worden. Dieses begrenzte Auftreten des verantwortlichen Enzymsystems innerhalb der Bakteriendomäne gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Lipidklasse auch in den *Bakterienschwämmen* von Vertretern dieser Taxa produziert werden. Da langkettige  $\alpha,\omega$ -DCA lediglich in anaeroben, überwiegend fermentierenden Bakterien auftreten (KLEIN *et al.*, 1979; HUBER *et al.*, 1986; REZANKA *et al.*, 1990; SCHLEGEL, 1992), ist anzunehmen, dass an O<sub>2</sub> abgereicherte Gewebekompartimente voluminös gebauter Schwämme (s. Kapitel 5.5.4) die Voraussetzungen für die Beherbergung dieser Organismen bieten. Hierbei müssen als Produzenten der DCA unbekannte nonthermophile Arten der o.g. Bakteriengruppen in Betracht gezogen werden, da die Temperaturbedingungen für meso- bis thermophile Organismen in den Habitaten der untersuchten Schwämme nicht gegeben sind. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass insbesondere die Gruppe der Clostridia, die strikt anaerobe bis aerotolerante Bakterien umfasst, naturgemäß sehr selten im (gut durchlüfteten) marinen Bereich auftritt und in Schwämmen bis jetzt lediglich im Gewebe eines Exemplares des aus der Tiefsee geborgenen Demospongiae der Gattung Discodermia mit Hilfe von Gensequenzanalysen nachgewiesen worden ist (LOPEZ *et al.*, 1999). Unter den Thermotogales finden sich dagegen ausnahmslos anaerobe, extrem thermophile Organismen (MADIGAN *et al.*, 1997). Abschließend kann also angenommen werden, dass nonthermophile, anaerobe Angehörige bevorzugt der Clostridiales langkettige DCA in bakterienreichen Schwämmen produzieren. Da bislang keine DCA-Produzenten aus Schwämmen isoliert wurden, können zu ihren physiologischen Eigenschaften und zu der Frage, ob sie, wie viele weitere ihrer Verwandten, fermentative Stoffumsätze tätigen, keine Angaben gemacht werden.

Werden für die bakterielle Biosynthese der beobachteten gesättigten C<sub>30</sub>- und C<sub>32</sub>-DCA die bekannten Synthesemechanismen vorausgesetzt, so liegen strukturell mögliche Vorläuferverbindungen in den Schwämmen vor. Nach JUNG *et al.* (1994) werden beispielweise von *Thermoanaerobacter ethanolicus* für die Synthese verschiedener langkettiger 13,16-dimethylverzweigter Verbindungen die ebenfalls in diesem Organismus in hohen Konzentrationen auftretenden *i*-verzweigten kurzkettigen Monocarbonsäuren mit 14 bis 17 C-Atomen genutzt. Mit erkennbaren

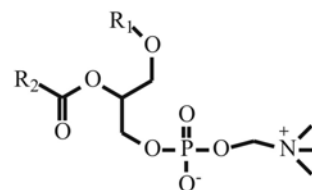
Anteilen wurden diese Komponenten auch für die untersuchten Schwämme erfasst (Tabelle C, Anh.). Bei einem Vergleich der Isotopensignaturen wahrscheinlicher Vorläuferverbindungen (*i*-C<sub>15:0</sub> und *i*-C<sub>16:0</sub>) der 13,16-Dimethyl-1,31-dicarbonsäure in *G. barretti* fallen Abweichungen von 2,8 bis 4,0 [‰] auf. Ebenso wie für die phylogenetische Zuordnung, scheint zur Klärung der Biosyntheseleistung der DCA-Produzenten in Schwämmen ihre Isolierung unerlässlich zu sein.

### 5.3 Nichtisoprenoide Glyceroletherlipide

In Bakterien sind zwei grundlegende Typen der Etherlipide, die sich in ihrer Bindungsform unterscheiden, vertreten. Beide Lipidklassen, die als Alkylether und als Plasmalogene bezeichnet werden, sind in ihrem Auftreten in der Bakteriendomäne auf wenige Gruppen begrenzt. Die Alkylether umfassen gesättigte Etherbindungen an einem Glycerolskelett und unterscheiden sich durch diese von den Plasmalogenen (s. Kapitel 5.3.2), in denen die Seitenkette über eine Alk-1-enyl-(Vinylether-)bindung mit dem Glycerol verknüpft ist. Aufgrund ihrer engen biosynthetischen Beziehung treten in Bakterien Alkylether und Plasmalogene oftmals gemeinsam auf (GOLDFINE und LANGWORTHY, 1988). Im Unterschied zu den aus Archaeen bekannten Etherlipiden besitzen die der Bakterien nichtisoprenoide Strukturen des Alkylrests, so dass bakterielle Alkylether als Kondensationsprodukte eines primären (Fett-)Alkohols und eines Glycerols anzusehen sind.

Begründet durch das begrenzte Auftreten von MAGE (Monoalkylglyceroletherlipide) wird gemutmaßt, dass diese Lipidbestandteile als erdgeschichtliche Relikte ursprünglicher Mikroorganismen essentielle Funktionen in der Stabilisierung des Molekülverbands in der Zytoplasmamembran verschiedener Bakterien extremer Standorte übernehmen (MANGOLD und WEBER, 1987). Von großem Interesse sind Etherlipide aber auch aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Effekte (MANGOLD, 1972). SMITH und DJERASSI (1987) vermuten aufgrund der antimikrobiellen Wirkung von MAGE gegen *Streptococcus mutans* (BRISSETTE *et al.*, 1986), dass die Verbindungsklasse eine wichtige Rolle für die Verteidigungsmechanismen von Schwämmen spielt. MYERS und CREWS (1983) zeigten, dass ein Stereoisomer des 1-Tridecylglycerols fischtoxisch auf *Carassius auratus* (Goldfisch) wirkt. Von besonderem pharmakologischem Interesse ist auch die Klasse der multifunktionalen und hoch potenten 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Abb. 5.18), die in verschiedenen Gewebeteilen der Eukaryoten als Signalstoffe schon in Konzentrationen von 0,1 nM z.B. die Aggregation von Thrombocyten und Gefäßerweiterung auslöst und deshalb als Thrombocytenaktivierungsfaktor (engl. platelet activating factor, PAF) bezeichnet wird (LIANOS und ZANGLIS, 1987; MANGOLD und WEBER, 1987; PALTAUF, 1994).

Auch die Gruppe der Lyso-PAF, d.h. an C-2 des Glycerols deacetylierte Metaboliten der PAF, ist gut untersucht, und häufig zeigen ihre Mitglieder intensive biologische Wirkungen. So wurden beispielsweise für mehrere Lyso-PAF mit divers strukturierten Alkylresten, die aus dem hadromeriden *Spirastrella abata* isoliert wurden, spezifische Hemmungen der Cholesterolsynthese in kultivierten Leberzellen nachgewiesen (SHIN *et al.*, 1999).



**Abbildung 5.18** Strukturformel eines 1-*O*-alkyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholins als Beispiel für ein PAF (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = Alkylrest).

Während zahlreiche Etherlipide gehäuft auch in Krebszelllinien zu finden sind, werden andere Vertreter dieser Substanzklasse aufgrund ihrer antitumoralen oder radioprotektiven Wirkung in der Krebstherapie eingesetzt (MANGOLD, 1972; MANGOLD und WEBER, 1987; SNYDER, 1999).

Für die Plasmalogene wurde in zahlreichen Studien an anaeroben Bakterien gezeigt, dass ihre Anwesenheit bzw. die Struktur ihrer Alkylketten die Membranfluidität bei verschiedenen Umgebungstemperaturen steuern (GOLDFINE und LANGWORTHY, 1988). Ferner sind zytostatische Effekte für verschiedene Alkenyletherlipide festgestellt worden (PALTAUF, 1994). Eine umfassende Übersicht über die biologischen Aktivitäten natürlicher und synthetischer Etherlipide geben die Artikel von MANGOLD (1972), MANGOLD und WEBER (1987), PALTAUF (1994), LEE (1998) und SNYDER (1999).

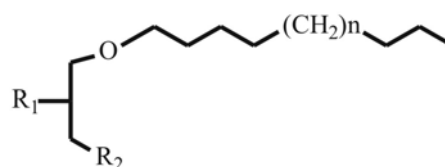
### 5.3.1 Monoalkylglycerolether

#### Einführung

Nichtisoprenoide Monoalkylglycerolether (MAGE) sind mit Substituenten an allen drei C-Atomen des Glycerols bekannt. Als einzige Produzenten des in den untersuchten Poriferen beobachteten 1-*O*-alkyl-*sn*-glycerol (frei sowie an C-2 und/oder C-3 verestert) sind bis jetzt mit sehr wenigen Ausnahmen anaerobe Bakterien, Animalia und einige marine Invertebraten bekannt (ISAY *et al.*, 1976; PETTIT und FUJII, 1982; LANGWORTHY und POND, 1986b; MANGOLD und WEBER, 1987; PALTAUF, 1994; WAGNER *et al.*, 2000). Unter den Bakterien sind die an C-1 des Glycerols alkylierten Monoglycerolether (Abb. 5.19) vorherrschend und gewöhnlich treten in der Natur Alkylreste mit 16, 18 und 20 C-Atomen auf (MANGOLD und WEBER, 1987).

Im Allgemeinen treten unveresterte MAGE im Vergleich zu ihren substituierten Analoga (wie 1-*O*-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycerole, 1-*O*-alkyl-2-acyl-*sn*-glycero-3-phospholipide und weitere alkyl-acyl-glycerol-Derivate) in Organismen deutlich seltener auf (z.B. LANGWORTHY und POND, 1986b; GOLDFINE und LANGWORTHY, 1988). Die an den Positionen 2 und 3 estergebundenen MAGE werden sowohl von niederen (Anthozoen) als auch höheren marinen Organismen erzeugt und sind beispielsweise Hauptbestandteile in den Leberölen zahlreicher Elasmobranchier (Haie). Die Beobachtung der bevorzugten Synthese strukturell verschiedener Alkylreste durch individuelle Knorpelfischordnungen führte zur Einführung abgeleiteter Trivialnamen wie Chimyl- (1-*O*-hexadecyl-*sn*-glycerol), Batyl- (1-*O*-octadecyl-*sn*-glycerol), oder Selachyl-alkohol (1-*O*-octadec-9-enyl-*sn*-glycerol) für das jeweilige unveresterte Molekül.

In Bakterien sind ethergebundene Teilstrukturen seltene Lipidbestandteile, die mit sehr wenigen Ausnahmen auf anaerobe bzw. mikroaerophile Gruppen beschränkt sind (LANGWORTHY und POND, 1986b). Unterschiedlich substituierte MAGE wurden in wenigen Angehörigen der innerhalb der Bacteria-Domäne phylogenetisch niedrig positionierten hyperthermophilen Aquificae (HUBER *et al.*, 1992; DECKERT *et al.*, 1998; JAHNKE *et al.*, 2001), dem hyperthermophilen *Thermotoga maritima* (DE ROSA *et al.*, 1988), dem thermophilen, anaeroben Sulfatreduzierer *Thermodesulfobacterium*



**Abbildung 5.19** Allgemeine Strukturformel natürlicher *sn*-1-*O*-Alkylglyceride ( $n \approx 5-13$ ;  $R_1 = \text{OH}$  oder Acylrest;  $R_2 = \text{OH}$ , Acylrest oder polare Kopfgruppe).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

---

(früher *Thermodesulfotobacterium*) *commune* (LANGWORTHY *et al.*, 1983) und Ammonium oxidierenden Angehörigen der Planctomycetales (SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002c) beobachtet.

Ebenso ist diese Lipidklasse von den thermophilen Clostridien (Firmicutes) *C. thermosulfurogenes*, *C. thermohydrosulfuricum*, *C. thermocellum* und *Ammonifex degensii* (LANGWORTHY und POND, 1986b; HUBER *et al.*, 1996) bekannt. GATTINGER *et al.* (2002) fanden in den mesophilen Vertretern *C. aceticum* und *C. butyricum* *n*-Hexadecan und *n*-Octadecan als ethergebundene Bestandteile unbestimmter Etherlipide. Mit *Mycoplasma fermentans* wurde zudem ein unter aeroben Bedingungen kultivierbarer Produzent von 1-*O*-alkyl-glycerolipiden in der Klasse der Mollicutes entdeckt (WAGNER *et al.*, 2000). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde über das Vorkommen verschiedener 1-*O*-alkyl-2-acyl-Phospholipide in den mesophilen  $\delta$ -Proteobakterien *Desulfosarcina variabilis* und *Desulforhabdus amnigenus* berichtet (RÜTTERS *et al.*, 2001).

Wie neuere Arbeiten zeigen, sind bis jetzt unbekannte bakterielle MAGE-Produzenten auch mit der anaeroben Oxidation von Methan (AOM) an *Cold Seeps* assoziiert. So fanden ORPHAN *et al.* (2001) in einem Kern anoxischen, CH<sub>4</sub>-seep-assoziierten Sediments des Kalifornischen Kontinentalhangs (Eel-River-Becken), für das aktive AOM angenommen wird (HINRICHS *et al.*, 1999), unveresterte, strukturell variable *sn*-1-C<sub>14</sub>- bis C<sub>18</sub>-MAGE. Mit -76,7 bis -86,5 ‰ wurden für das *cis*- $\omega$ 7-C<sub>16:1</sub>-MAGE im Sedimentprofil äußerst geringe Isotopenwerte festgestellt, die mit der direkten oder indirekten Aufnahme von CH<sub>4</sub>-Kohlenstoff erklärt werden (ORPHAN *et al.*, 2001). FISH-Experimente unterstrichen die Dominanz des mikrobiellen Inventars durch methanotrophe Archaeen und Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien der Gattungen *Desulfosarcina* und *Desulfococcus*, so dass ein Beitrag bakteriogener Etherlipide auf bislang unbekannt mit der AOM vergesellschaftete mesophile Bakterien – möglicherweise der  $\delta$ -Proteobacteriagruppe – zurückgeführt werden kann. Vorkommen verschiedener MAGE mit teilweise deutlich geringeren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (bis -111 ‰) aus weiteren AOM-assoziierten Standorten, wie dem Santa-Barbara- und Eel-River-Becken (*sn*-1-MAGE; HINRICHS *et al.*, 2000) oder dem östlichen Mittelmeer (*sn*-2-MAGE; PANCOSE *et al.*, 2001a; ALOISI *et al.*, 2002), wurden auch hier auf nicht kultivierte Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien zurückgeführt. Freie, strukturell nicht spezifizierte MAGE mit C<sub>16:0</sub>- und C<sub>18:1</sub>-Alkylresten wurden ferner in den Lipidextrakten aus einem Kern hydrothermal beeinflusster, AOM-assoziierten Sedimente des Guaymas Becken (TESKE *et al.*, 2002) festgestellt. Die Anreicherung an <sup>13</sup>C ( $\delta^{13}\text{C}$  = -38 bis -41 ‰) sowie die Abwesenheit der MAGE in unweit entnommenem und ebenfalls AOM-assoziiertem Sediment werten die Bearbeiter als direkten Hinweis auf die Beteiligung der MAGE-Produzenten an spezifischen AOM-Konsortien.

Ebenso wurden in hydrothermal beeinflussten terrestrischen Habitaten verschiedene MAGE beobachtet. JAHNKE *et al.* (2001) beschrieben Vertreter der Lipidklasse mit C<sub>18</sub>- bis C<sub>21</sub>-Alkylresten nach Hydrolyse aus einer als ‚Pink streamer community‘ bezeichneten hyperthermophilen Mikrobengemeinschaft der mit 87°C temperierten ‚Octopus Spring‘- Quelle (Yellowstone National Park). Aufgrund der Daten aus simultanen Untersuchungen von 16S-rRNA-Gensequenzen und der Lipidbiomarker vermuten die Autoren, dass die Produzenten in diesem Probenmaterial den Aquificales zugehörig sind. Abschließend ist somit festzuhalten, dass mit wenigen Ausnahmen MAGE enthaltende Bakterien in O<sub>2</sub>-freien bzw. -abgereicherten Milieus auftreten.

Außer in Bezug zu den genannten Bakterien, einigen Protisten sowie diversen weiteren marinen Vertebraten und Invertebraten (MALINS und VARANASI, 1972; THOMPSON, 1972; KANESHIRO, 1987;



MACPHERSON *et al.*, 1998), ist selten auch von nichtisoprenoiden MAGE in Schwämmen berichtet worden und interessanterweise treten sie in letztgenannten Organismen überwiegend in der ungebundenen Form auf. So wurden freie 1-*O*-Alkylglycerole, wie Chimyl-, Batyl- und Selachylalkohol, von verschiedenen Spezies der Demospongiae-Ordnungen Hadromerida, Poecilosclerida und Halichondrida (MYERS und CREWS, 1983; SCHMITZ *et al.*, 1983; SMITH und DJERASSI, 1987; PRINSEP *et al.*, 1989), deren Alkylreste 13 bis 18 C-Atome aufweisen, beschrieben. Für die vom hadromeriden Schwamm *Tethya aurantia* produzierten *n*-C<sub>16:0</sub>-, *i*-C<sub>17:0</sub>- und *ai*-C<sub>17:0</sub>-Monoalkylether wurde gezeigt, dass diese sowohl frei als auch als Bestandteil der Phospholipidfraktion auftreten (SMITH und DJERASSI, 1987). DEMBITSKY *et al.* (1989) untersuchten die Zusammensetzung der Phospholipidklassen in 19 Kaltwasserschwämmen des Weißen Meeres und der Barentsee und beobachteten für nahezu alle Exemplare strukturell unbestimmte 1-*O*-alkyl-2-acyl- und 1-*O*-alk-1-enyl-2-acyl-Phospholipide in höheren Konzentrationen als die in der Natur weiter verbreiteten 1,2-diacyl-Phospholipide.

Eine große Varianz der Alkylkettenlänge freier MAGE mit C<sub>14</sub> bis C<sub>21</sub>-Seitenketten wurde von QUIJANO *et al.* (1994) von dem poeciloscleriden *Desmapsamma anchorata* beschrieben. MS-Analysen isolierter MAGE belegten ferner das Auftreten verschiedener Strukturisomere (lineare und vermutlich endständig methylverzweigte) der C<sub>16</sub>- bis C<sub>19</sub>-Verbindungen in diesem Schwamm. Mit C<sub>24:1</sub> in *Cinachyra alloclada* und *Ulosa ruetzleri* (CARDELLINA II *et al.*, 1983) sowie C<sub>13</sub> in einem nicht identifizierten poeciloscleriden Schwamm (MYERS und CREWS, 1983) wurden extrem lang- bzw. kurzkettige Alkylreste dokumentiert. Die Anwesenheit ungewöhnlicher mittkettig verzweigter 3-*O*-Alkylglycerole in der hadromeriden Spezies *Aaptos* sp. wiesen DO und ERICKSON (1983) mit Hilfe verschiedener Analysemethoden (MS, NMR, IR) nach.

Die Synthese von Alkylketten in Etherlipiden erfolgt in mehreren biosynthetischen Schritten (Mangold und Weber, 1987; Paltauf, 1994):

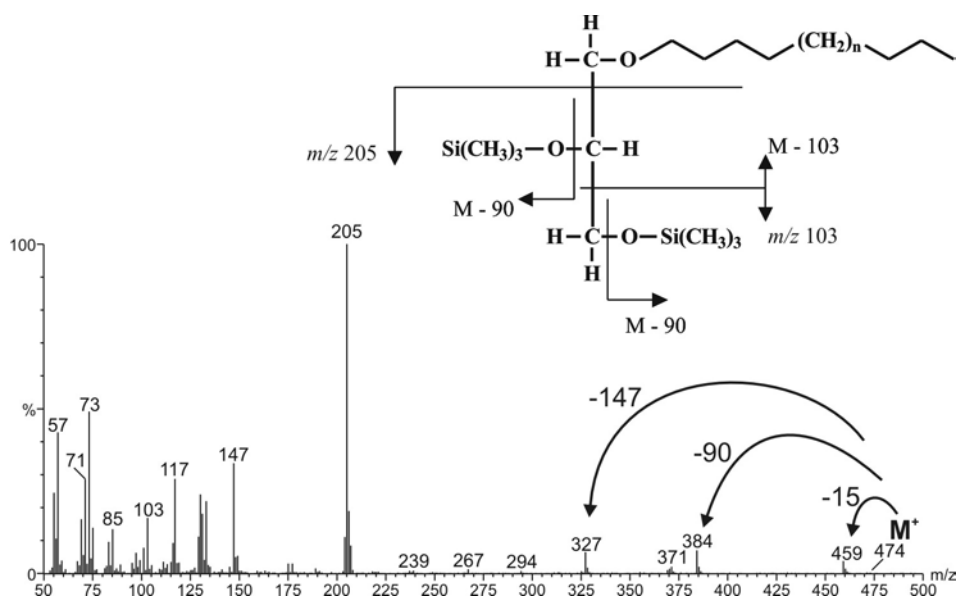
### Fettsäure ⇒ Aldehyd ⇒ Alkohol ⇒ Alkylether (⇒ 1-Alkenylether)

Zunächst erfolgt eine Reduktion von Acyl-CoA vorliegender FA, vermutlich über ihre Aldehyde, zu Alkoholen. Durch Reaktion der Alkohole mit Acyldihydroxyacetonphosphaten wird anschließend die Etherbindung gebildet (LEE, 1998; SNYDER, 1999). Die nachfolgende Reduktion der Alkyldihydroxyacetonphosphate führt zu Alkylglycerophosphaten, die schließlich zu Alkylacylglycerophosphaten acyliert werden.

Es ist bekannt, dass die Biosynthese freier 1-*O*-Alkylglyceride in Eukaryoten generell aus der Entfernung der 3-Phosphatgruppe von 1-*O*-Alkylglycerol-3-phospholipiden resultiert (STRYER, 1995). Für *Tethya aurantia* vermuten SMITH und DJERASSI (1987) aufgrund der chemischen Struktur der MAGE, dass die Alkylreste bakteriogenen Ursprungs sind. Wie Inkorporationsversuche mit <sup>14</sup>C-markierten Verbindungen an dissoziierten Schwammzellen nahe legen, werden abschließende biosynthetische Schritte jedoch vom Wirtsorganismus durchgeführt. Dagegen sind die in Bakterien wirksamen Bildungsmechanismen für MAGE nicht vollständig geklärt (GOLDFINE und LANGWORTHY, 1988; SNYDER, 1999).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Diagnostisch für *bis*-TMS-derivatisierte 1-*O*-Alkylglyceride (und 3-*O*-Alkylglyceride) bei der MS-Analyse (EI-Mode) ist der Basispeak  $m/z$  205 (EGGE, 1983), der aus der Spaltung zwischen C-1 und C-2 (bzw. C-2 und C-3) des Glycerolskeletts hervorgeht (Abb. 5.20). Weitere indikative Fragmente sind  $[M - 15]^+$ ,  $[M - 90]^+$ ,  $[M - 103]^+$  und  $[M - 147]^+$ . Für die Bildung des Ionenfragments  $[M - 147]^+$  wurden unterschiedliche Erklärungsansätze vorgeschlagen. LIEFKENS *et al.* (1979) und MYHER *et al.* (1974) führen die parallele Abspaltung beider TMSi-Gruppen ( $73 + 74$  amu) auf die Genese dieses Fragments zurück. Nach EGGE (1983) ist dagegen  $[M - 147]^+$  Resultat der Abspaltung von  $[M - 90]$  (TMSi-OH) und eines Rests ( $m/z$  57) der an C-1 positionierten Alkylkette. Das Molekularion ist meist von sehr geringer Intensität, und Fragmente, die interne Methylverzweigungen des Alkylrests indizieren, sind ebenfalls undeutlich (EGGE, 1983). Anhand ihrer Fragmentmuster können 1-*O*-Alkylglyceride eindeutig von 1-*O*-Alkenylglyceriden und 2-*O*-Alkylglyceriden unterschieden werden (MYHER *et al.*, 1974; EGGE, 1983).

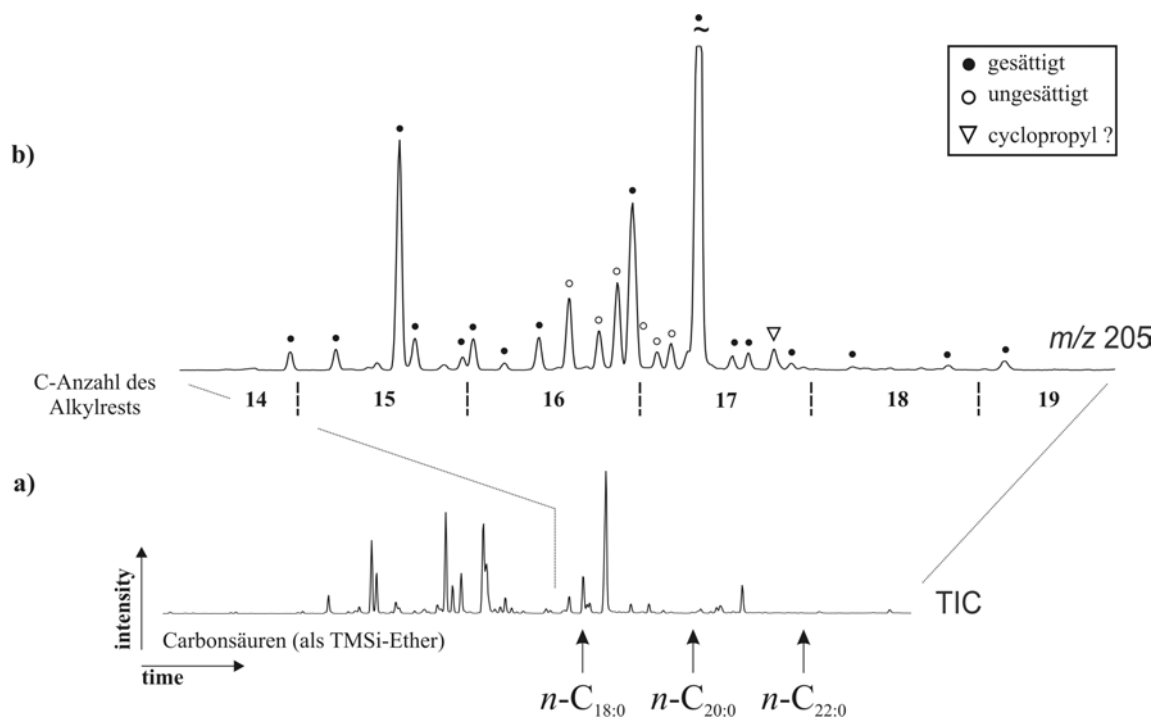


**Abbildung 5.20** Bevorzugte MS-Fragmentierung von 1-*O*-alkyl-2,3-*bis*trimethylsilylethern und Spektrum (EI<sup>+</sup>) des 1-*O*-heptadecyl-2,3-*bis*trimethylsilylethers.

### Ergebnisse

Zahlreiche nichtisoprenoide MAGE wurden als ihre *bis*trimethylsilylether-Derivate in der semi-polaren Fraktion (FA) gesamtorganischer Extrakte sowie in der Neutrallipidfraktion nach alkalischer Hydrolyse ausgewählter Schwämme beobachtet. Hinsichtlich ihres Auftretens wird daher davon ausgegangen, dass MAGE in den untersuchten Poriferen sowohl ungebunden als auch als Bestandteile komplexer Moleküle vorliegen. Die vorläufige Strukturzuordnung erfolgte anhand der oben genannten indikativen Fragmente und relativen Retentionszeiten.

Abb. 5.21 zeigt exemplarisch ein partielles Gesamtionenstrom-Chromatogramm sowie die Ionenspur  $m/z$  205 (Basispeakchromatogramm) der Fraktion freier FA aus *Haliclona* sp. 1.



**Abbildung 5.21** Partielles TIC-Chromatogramm der Fraktion a) freier FA und b) Ionenspur  $m/z = 205$  (Basispeakchromatogramm) von MAGE in *Haliclona* sp.1.

Aufgrund des in der Natur deutlich häufigeren Auftretens der 1-*O*-MAGE im Vergleich zu ihren an C-3 alkylierten Strukturverwandten ist es sehr wahrscheinlich, dass die gefundenen Komponenten den 1-*O*-Alkylglyceriden zuzuordnen sind. Eine Fraktionierung und Spaltung der Monoalkyl-etherlipide wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Aufgrund fehlender Standardsubstanzen konnten die Strukturen der Alkylreste nicht ermittelt werden, so dass MAGE aus *Haliclona* sp. 1 in Tabelle 5.4 nach der C-Anzahl der Alkylreste sortiert sind.

**Tabelle 5.4** Verteilung nicht substituierter nichtisoprenoider Monoalkylglyceride aus *Haliclona* sp. 1.

Alkylrest	[%]
Tetradecanol	1,1
Pentadecanol	17,1
Hexadec-?-enol	11,8
Hexadecanol	16,9
Heptadec-?-enol, Cyclopropylhexadecanol ?	4,7
Heptadecanol	45,3
Octadecanol	0,9
Nonadecanol	0,9

unbestimmte MAGE = 0,2 %

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Wie aus Tabelle 5.4 hervorgeht, wurde in *Haliclona* sp. 1 ein komplexes Gemisch gesättigter und einfach ungesättigter 1-*O*-MAGE, deren Alkylreste 14 bis 19 C-Atome umfassen, beobachtet. Hauptkomponente der Lipidklasse ist ein Isomer des 1-*O*-Hexadecylglycerols mit 42,8 % (der MAGE), gefolgt von einem C<sub>15</sub>-Homolog (13,4 %). Sehr ähnliche Verteilungen wurden auch in den weiteren MAGE enthaltenden Poriferen festgestellt. Das Auftreten von MAGE in den untersuchten Schwämmen ist in Tabelle 5.5 dargestellt.

**Tabelle 5.5** Auftreten nicht substituierter 1-*O*-MAGE in Hexactinellida und Demospongiae.

Klasse	Subklasse	Ordnung	Spezies	MAGE
Hexactinellida	Hexasterophora	Lyssakinosa	<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>	
		Hexactinosida	<i>Ipheton panicea</i>	○
	Amphidiscophora	Amphidiscosida	<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1 <i>Hyalonema</i> sp. 2	○
Demospongiae	Tetractinomorpha	Astrophorida	<i>Geodia barretti</i>	●
			<i>Geodia macandrewii</i>	●
			<i>Isops phlegraei</i>	●
			<i>Pachymatisma johnstonii</i>	●
			<i>Thenea muricata</i>	
	Ceractinomorpha	Poecilosclerida	<i>Mycale lingua</i>	
		Haplosclerida	<i>Oceanapia robusta</i>	●
			<i>Haliclona</i> sp. 1	●
Halichondrida	<i>Phakellia ventilabrum</i>			
	<i>Phakellia robusta</i>	○		
		<i>Axinella rugosa</i>		

● = rel. hohe Konzentrationen; ○ = in Spuren; kein Eintrag = nicht nachgewiesen

Aus Tabelle 5.5 ist zu erkennen, dass 1-*O*-MAGE in deutlichen Konzentrationen in einigen Spezies verschiedener Demospongiae-Ordnungen auftreten. In geringen Gehalten wurden diese Verbindungen auch in zwei Hexactinellida gefunden.

Die für die MAGE gewonnenen Ergebnisse werden gemeinsam mit den Daten für Plasmalogene am Ende des Kapitels 5.3 diskutiert.

### 5.3.2 Plasmalogene

#### Einführung

Glycerophospholipide mit ungesättigter Etherbindung an C-1 des Glycerols werden Plasmalogene genannt. Chemisch betrachtet sind die ethergebundenen Teilstrukturen der Plasmalogene Kondensationsprodukte aus (Fett-)Aldehyden und Glycerol (Abb. 5.22). In den meisten Fällen sind Plasmalogene an C-2 acylverestert (LANGWORTHY, 1985).

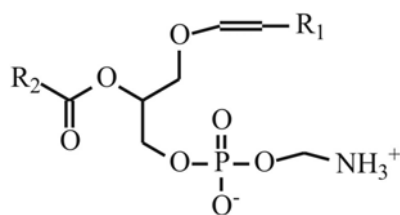
Die Bezeichnung der Plasmalogene geht auf FEULGEN und VOIT (1924) zurück, die Aldehyde als säureinduzierte Spaltprodukte dieser Lipidklasse in tierischem Zellplasma nachwiesen. Wie auch die Alkylglyceroletherlipide, die oftmals als ihre biosynthetischen Vorläufer identifiziert worden sind, treten Plasmalogene sowohl in wenigen Bakterien als auch in Animalia auf. Archaeen sind frei von dieser Substanzklasse (GAMBACORTA *et al.*, 1994).

In der Domäne der Bakterien sind Gram-positive und -negative Organismen, die oftmals auch Alkyletherphospholipide beinhalten, Träger von Plasmalogenen (KAMIO *et al.*, 1969; GOLDFINE und HAGEN, 1972). Bakterielle Plasmalogene umfassen typischerweise C<sub>14</sub>- bis C<sub>19</sub>-Alkenylreste. Wenngleich Plasmalogene auch von verschiedenen Angehörigen der Proteobakterien (*Desulfovibrio* sp., *Propionibacterium* sp.), der Bacteroidetes (*Bacteroides* sp.) und der Spirochaetes (*Borrelia* sp.) bekannt sind, sind die Berichte aus meso- und thermophilen Clostridien auffallend häufig. Dabei trug insbesondere eine Studie von KAMIO *et al.* (1969) zur Kenntnis von Plasmalogenen in vielen mesophilen Clostridien bei. Dimere Plasmalogene, die über eine jeweils an C-2 estergebundene langkettige DCA gekoppelt sind, sind für *Butyrivibrio* sp. beschrieben (CLARKE *et al.*, 1980). In den thermophilen Clostridia *C. thermocellum*, *C. thermosulfurogenes* und *C. thermohydrosulfuricum* wurden vornehmlich terminal verzweigte Aldehydreste in den Plasmalogenen vorgefunden (LANGWORTHY und POND, 1986b).

Seit einigen Jahren sind auch Plasmalogene aus vereinzelt aeroben bzw. aerotoleranten Bakterien bekannt (HARWOOD und RUSSELL, 1984), und erst kürzlich gelang der Nachweis der Lipidklasse in dem aerob kultivierten *Mycoplasma fermentans* (WAGNER *et al.*, 2000). Allgemein scheinen Plasmalogene bevorzugt in anaeroben Bakterien mit fermentierenden oder Sulfat reduzierenden Stoffwechsellätigkeiten aufzutreten.

Ebenso wie die Alkylglycerolipide sind Glycerolipide mit Alk-1'-enylresten nicht auf die Domäne der Bakterien beschränkt, sondern wurden auch in höheren Organismen gefunden. Insbesondere in höheren Tieren treten 1-O-alkenyl-2-acylglycerophospholipide in hohen Konzentrationen in spezifischen Organen wie dem Herz, der Leber, dem Skelettmuskelapparat oder dem zentralen Nervensystem auf (MALINS und VARANASI, 1972; GOLDFINE und LANGWORTHY, 1988; MACPHERSON *et al.*, 1998). Aber auch in den Phospholipiden von Protozoen, Asteroideen und Poriferen wurden Plasmalogene gesichtet (PALTAUF, 1994).

Aus *Petrosia hebes* gelang die Isolierung langkettiger, polyungesättigter, OH-substituierter Plasmalogene, für die eine Funktion als Bestandteil der Schwamm-Zytoplasmamembran angenommen wird (PERRY *et al.*, 1990). Den Befund verschiedener Phospholipidklassen des Plasmalogenotyps in allen untersuchten arktischen Poriferen führen DEMBITSKY *et al.* (1989) auf die Synthese durch die Wirtsorganismen zurück. Für Plasmalogene mit relativ langkettigen Alk-1'-enylresten (C<sub>22</sub> bis C<sub>25</sub>), die in nahezu allen der bearbeiteten Demospongien gefunden wurden, vermutet BLUMENBERG (2003) ebenfalls Schwämme als Produzenten.

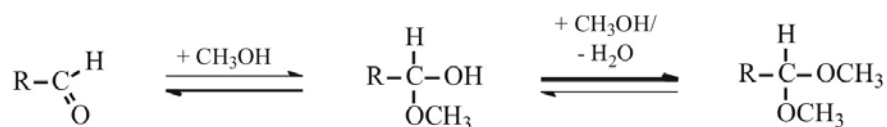


**Abbildung 5.22** Strukturformel eines 1-O-Alk-1'-enyl-glycerids am Beispiel eines Plasmenylethanolamins (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = Alkylrest).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Bakterielle und eukaryotische Plasmalogene treten aufgrund ihrer biosynthetischen Beziehung zu Diacyl- und Alkylacylglycerolipiden oftmals gemeinsam mit diesen auf. Von beiden Organismengruppen werden FA als Vorläufermoleküle des Alkylrests der Etherlipide eingesetzt. In Animalia erfolgt die Genese der Plasmalogene durch die Einführung einer Doppelbindung in die Alkylgruppe eines *sn*-1-Alkylglycerolipids mittels einer sauerstoffabhängigen  $\Delta$ 1-Alkyl-Desaturase (SNYDER, 1999). Dagegen sind die Bildungsmechanismen dieser Lipidklasse in Bakterien noch relativ unklar, und es wurden bei Studien an Bakterienkulturen verschiedenartig orientierte Biosyntheseschritte beobachtet (GOLDFINE und HAGEN, 1972; GOLDFINE und LANGWORTHY, 1988)

In den Schwämmen wurden aus Plasmalogenen freigesetzte Aldehyde als ihre Dimethylacetale (Dimethoxy-Derivate) analysiert. Die Spaltung der Alkenylbindungen von Plasmalogenen im sauren Milieu setzt Aldehyde frei. Bei Anwesenheit von Methanol, wie z.B. bei der hier durchgeführten Transveresterung mit TMCS, werden die daraus resultierenden Aldehyde gemäß des in Abb. 5.23 gegebenen Schemas schrittweise zu ihren Dimethylacetalen umgesetzt. Das Reaktionsgleichgewicht liegt hierbei stark auf der Seite des Endprodukts.



**Abbildung 5.23** Schema der Transformation eines Aldehyds in sein Dimethylacetal mit MeOH (R = Alkylrest).

Das Auftreten von Dimethylacetalen als Degradationsprodukte gibt somit indirekt Auskunft über die Präsenz von Plasmalogenen im Probenmaterial. Charakteristisch für Dimethylacetale bei der MS-Analyse sind die Hauptfragmente  $m/z$  71 und 75, die durch McLafferty-Umlagerung der funktionellen Gruppe ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2^+$  und  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$ ) entstehen. Prägnante Fragmentationen sind  $[\text{M} - 32]^+$  und  $[\text{M} - 64]^+$ , die auf die Abspaltung von MeOH bzw. 2 MeOH zurückgeführt werden.

### Ergebnisse

Kurzkettige Dimethylacetale ( $\leq \text{C}_{19}$ ) wurden in vereinzelten Exemplaren der Hexactinellida und der Demospongiae, in denen sie in der FAME-Fraktion (SPE 2) nach saurer Hydrolyse des Zellmaterials auftreten, vorgefunden. In Tabelle 5.6 sind die Schwämme aufgeführt, in denen Dimethylacetale gefunden wurden.

Tabelle 5.6 Auftreten von Dimethylacetalen in den Poriferen.

Klasse	Subklasse	Ordnung	Spezies	Dimethylacetale
Hexactinellida	Hexasterophora	Lyssakinosa	<i>Staurocalyptus</i> sp. A	○
			<i>Acanthascus</i> sp. A	○
			<i>H</i> -unknown sp. 1	●
			<i>H</i> -unknown sp. 2	●
			<i>Sympagella</i> cf. <i>nux</i>	●
			<i>Sympagella</i> sp. nov	●●
			<i>H</i> -unknown sp. 4	○
			<i>H</i> -unknown sp. 5	○
			<i>H</i> -unknown sp. 6	●●
Amphidiscophora	Amphidiscosida	<i>H</i> -unknown sp. 9	●●	
Demospongiae	Ceractinomorpha	Poecilosclerida	<i>D</i> -unknown sp. 1	●●
			<i>D</i> -unknown sp. 2	○
			<i>Forcepia forcipis</i>	○
			Dendroceratida	<i>D</i> -unknown sp. 4

Gesamtgehalte: ○ = < 0,5 % der SCFA; ● = 0,5–2,0 % der SCFA; ●● = > 2,0 % der SCFA)

Wie Tabelle 5.6 zeigt, sind kurzkettige Dimethylacetale als Indikatoren bakterieller Plasmalogene in ceractinomorphen Demospongiae in drei Angehörigen der Poecilosclerida und einem dendroceratiden Schwamm vertreten. In den Hexactinellida wurden die Komponenten lediglich in Vertretern der Hexasterophora-Ordnung der Lyssakinosa sowie in einer hyalonematiden Spezies beobachtet. Höchste Gehalte der Lipidklasse wurden in der Summe mit 4,5 % am SCFA-Inventar in der lyssakinosiden Spezies *H*-unknown sp. 6 festgestellt.

Im Allgemeinen hervortretend sind lineare gesättigte Dimethylacetale mit 15 bis 18 C-Atomen, die bei der gaschromatographischen Analyse 0,48 ECL-Einheiten nach den gesättigten FAME gleicher Kettenlänge eluieren. Anhand der Basisfragmente *m/z* 71 bzw. 75 wurden vereinzelt weitere Dimethylacetale mit abweichendem Elutionsverhalten beobachtet, deren Struktur aufgrund undeutlicher Fragmentierungsmuster nicht ermittelt werden konnte.

### Diskussion

In den untersuchten Schwämmen sind 1-*O*-Monoalkylglycerole, deren Alkylreste 14 bis 19 C-Atome umfassen, vergleichsweise gering konzentriert, so dass sie lediglich in spezifischen Fraktionen der Extrakte gefunden werden können. Interessant ist, dass MAGE – wie am Beispiel von *Geodia macandrewii* gezeigt wurde – sowohl ungebunden als auch als Teilstrukturen höhermolekularer Etherglyceride auftreten.

Basierend auf den Literaturangaben bisheriger Untersuchungen an Poriferen und Bakterien müssen zunächst beide Gruppen als mögliche Quellen der MAGE in Betracht gezogen werden. So vermuteten DEMBITSKY *et al.* (1989) aufgrund des Auftretens hoher Gehalte unterschiedlicher Alkylacylphospholipidklassen in einer Reihe von Kaltwasserporiferen, dass diese Etherlipide von den Wirtsorganismen synthetisiert werden. Die Bearbeiter führen hierbei die phylogenetische Verwandtschaft zu den Protozoa, die ebenso Produzenten von MAGE sind, an. SMITH und DJERASSI

(1987) schließen aufgrund der Aufnahme radiomarkierten Hexadecanols durch dissoziierte Schwammzellen ebenfalls auf einen eukaryotischen Ursprung von MAGE in *T. aurantia*.

In den bearbeitenden Poriferen treten MAGE in vereinzelt Spezies verschiedener Demospongiae-Ordnungen auf, was ihre Eignung als chemotaxonomisches Merkmal für Poriferen ausschließt. Auffallend ist ferner, dass MAGE enthaltene Schwämme einen morphologisch kompakten Habitus wie z.B. die meisten Geodiidae aufweisen. Aufgrund der Koexistenz von MAGE und typischen Bakterienlipidmarkern, wie verschiedenen SCFA und den Dicarbonsäuren in diesen *Bacteriosponges*, ist die bakterielle Herkunft der Alkyletherlipide sehr wahrscheinlich. Die beobachteten Strukturen der Alkylreste mit 14 bis 19 C-Atomen sind weitere Eigenschaften der vorgefundenen MAGE, die diese Annahme stützen (GOLDFINE und HAGEN, 1972).

Bemerkenswert ist die Dominanz von Etherlipiden mit ungeradzahligem Alkylresten, die sich in dieser Untersuchung im Heptadecyl- und dem Pentadecylglycerol zeigte, und die bis jetzt nur aus dem thermophilen *Thermodesulfobacterium commune* sowie den thermophilen Clostridien *C. thermocellum*, *C. thermosulfurogenes* und *C. thermohydrosulfuricum* bekannt sind (LANGWORTHY *et al.*, 1983; LANGWORTHY und POND, 1986b). In einigen anderen Bakterienkulturen und verschiedenen  $\text{CH}_4$ -seep-assoziierten Mikrobengemeinschaften sind dagegen vorwiegend geradzahlig Alkylreste als Hauptkomponenten der MAGE-Fraktion festgestellt worden (HUBER *et al.*, 1996; HINRICHS *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2000; JAHNKE *et al.*, 2001; RÜTTERS *et al.*, 2001; TESKE *et al.*, 2002). Die in der Literatur beschriebenen MAGE aus Schwämmen verfügen, mit Ausnahme von *Tethya aurantia* (terminal verzweigte 1-O-Heptadecylglycerole) und einer unbestimmten Poecilosclerida-Art (1-O-Tridecylglycerol), über geradzahlig Alkylreste.

Für die untersuchten Schwämme kann somit angenommen werden, dass mit 1-O-Alkylglyceriden neue Lipidbiomarker für unbekannte SAM gefunden wurden. Angehörige mesophiler Bakteriengruppen mit nichtisoprenoiden Etherglyceriden, wie die Clostridia und Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien, sind mit mikrobiologischen Methoden für diese und andere Schwämme beschrieben worden (LOPEZ *et al.*, 1999; HOFFMANN, 2003; I. Kaesler, pers. Mitteilung). Prokaryotische Etherlipide gelten gemeinhin als lipidchemische Relikte ancestraler Organismen – vor diesem Hintergrund sind MAGE in Schwämmen möglicherweise Markerverbindung für eine in der Erdgeschichte frühzeitig angelegte Koevolution von Poriferen und SAB.

Für kurzkettige Dimethylacetale ( $\text{C}_{15}$  bis  $\text{C}_{18}$ ) in den Poriferen kann eine Abstammung von bakteriellen Plasmalogenen angenommen werden, da kurzkettige ungebundene Aldehyde in deutlichen Konzentrationen nicht von Schwämmen bekannt sind und Plasmalogene eukaryotischer Herkunft üblicherweise über länger-kettige Alkenylreste verfügen. Die Beobachtung sauerstofffreier Kompartimente in Schwämmen (HOFFMANN, 2003) gemeinsam mit der anaeroben Ökologie bekannter bakterieller Plasmalogen-Produzenten unterstreicht diese Annahme.

Es ist auffallend, dass kurzkettige Aldehyde ausnahmslos in Schwämmen auftreten, die nicht über hohe Gehalte typischer Bakterien-FA verfügen und daher allgemein den bakterienarmen Schwämmen zugeordnet werden. Möglicherweise lässt sich dieser Befund durch den drastisch erhöhten Anteil an SCFA, die gering konzentrierte Aldehyde bei der GC-MS-Analyse von *Bacteriosponges* überdecken, erklären.



In vielen der ebenfalls untersuchten Schwammspezies, zu denen auch zahlreiche *Bacteriosponges* gehören, wurden von BLUMENBERG (2003) signifikante Gehalte langkettiger Dimethylacetale festgestellt. Basierend auf dem vorherrschenden Auftreten ungeradkettiger Homologe in vielen bakterienreichen Schwämmen vermutet der Autor, dass sie kurzkettige, bakterielle Plasmalogene analog zur C<sub>2</sub>-Elongation konventioneller FA verlängern und in die Schwammzellmembran inkorporieren. In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Erklärungsansatz für das Fehlen kurzkettiger Plasmalogene in *Bacteriosponges* plausibel. Hiernach führt eine Elongation der in bakterienreichen Schwämmen festgestellten kurzkettigen Alkylglyceroletherlipide (MAGE) und nachfolgende Untersättigung, gemäß den bekannten eukaryotischen Biosynthesewegen, zu langkettigen Alkenylglyceroletherlipiden. Für einen solchen Synthesemechanismus ist die Anwesenheit kurzkettiger Plasmalogene in *Bacteriosponges* nicht notwendig. In jedem Fall scheinen kurzkettige Plasmalogene indikativ für spezielle Bakterien in bakterienarmen Schwämmen zu sein; sie sind aber allgemein für den Nachweis von SAB nicht geeignet.

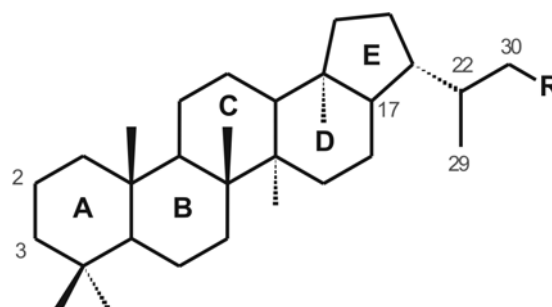
Aufgrund ihrer Spezifität für Bakteriengruppen ist das Vorkommen ethergebundener Lipidbestandteile dennoch von großem Interesse. Der Vergleich des Auftretens nichtisoprenoider MAGE und weiterer Bakterien-carbonsäuren wie mcb-SCFA oder langkettige Dicarbonsäuren in den Schwämmen zeigt eine weitestgehende Koexistenz dieser Lipidklassen. Für die Dicarbonsäuren und die MAGE fällt ferner auf, dass diese deutlich gehäuft in mesophilen Kultivaten der anaeroben Clostridia-Gruppe identifiziert wurden, und beide Lipidklassen gemeinsam in den thermophilen Clostridien *C. thermosulfurogenes* und *C. thermohydrosulfuricum* auftreten (LANGWORTHY und POND, 1986b). Es ist daher nahe liegend, eng verwandte mesophile Vertreter dieser Clostridia als Bestandteile der SAB anzunehmen. Wie hingegen verschiedene Studien an Bakterienkultivaten (RÜTTERS *et al.*, 2001) und natürlichen Proben (HINRICHS *et al.*, 2000; ORPHAN *et al.*, 2001), die MAGE dokumentierten, zeigten, sind auch noch unbekannte Angehörige Sulfat reduzierender  $\delta$ -Proteobakterien als Mitglieder der SAB-Gemeinschaft in Betracht zu ziehen. Die Frage, ob MAGE und Dicarbonsäuren in Schwämmen einer Bakteriengruppe entstammen, wird Gegenstand zukünftiger Studien sein müssen.

### 5.4 Hopanoide

#### Einführung

Hopanoide sind Derivate des pentacyclischen Triterpens Hopan (Abb. 5.24), die als Syntheseprodukte aus zahlreichen Bakterienkultivaten sowie verschiedenen niederen und höheren Pflanzen wie Farnen und Gräsern, aber auch aus Flechten und Pilzen bekannt sind. Die sog. Bakteriohopanoide sind essentielle Bestandteile der prokaryotischen Zytoplasmamembran, die diverse Verbindungen mit üblicherweise 30 und mehr C-Atomen umfassen. Hiermit grenzen sie sich gegenüber den Eukaryoten-Hopanoiden, die gemeinhin bis zu 30 C-Atome besitzen, ab. Im Allgemeinen stellen Hopanoide die bedeutendste organische Substanzklasse der Geosphäre dar (OURISSON und ALBRECHT, 1992).

Die Mitglieder der Hopanoide unterscheiden sich durch die Ausprägung der an Ring E gebundenen (alkyl-)Seitenkette sowie in der Anzahl und den chemischen Strukturen verschiedenartiger, an den weiteren Ringen lokalisierten Substituenten (OURISSON *et al.*, 1979; ROHMER *et al.*, 1984; ZUNDEL und ROHMER, 1985b; SUMMONS *et al.*, 1999). Allgemein umfasst die Gruppe der Hopanoide diverse Substanzklassen wie Cycloalkane und -alkene, Alkohole und Polyalkohole, Ketone, gesättigte und ungesättigte Säuren sowie Aldehyde (BRASSELL *et al.*, 1983). Den Hopanoiden gemein ist ein stabiles Grundgerüst, das eine hohe Resistenz gegen (bio-)degradative Prozesse aufweist (MYCKE *et al.*, 1987).



**Abbildung 5.24** Struktur des Hopanoidgrundgerüsts am Beispiel des Hopans (R = H), Zahlen und Buchstaben geben die Zählung der C-Atome bzw. -Ringe nach IUPAC-Nomenklatur an.

Auch aus diesem Grund finden sich diagenetisch überprägte Verbindungen mit Hopanskelett in Ablagerungen mit biogenen Beimengungen in weiter Verbreitung und oftmals hohen Konzentrationen, so dass diese als Gruppe der Geohopanoide klassifiziert wurden (VAN DORSSELAER *et al.*, 1977; OURISSON *et al.*, 1979). Mikrobielle und diagenetische Modifikationen, die sich auf Funktionalitäten und/oder sterische Konfigurationen auswirken, führen zu einer Vielzahl verschiedener Strukturen der molekularen Fossilien (FREEMAN *et al.*, 1990; OURISSON und ALBRECHT, 1992). Typische Transformationsprodukte höherfunktionalisierter Hopanoide mit weiter sedimentärer Verbreitung sind Serien von Hopan-KW, Hopansäuren bzw. Hopanolen, die oftmals von C<sub>32</sub>-Komponenten dominiert werden (Abb. 5.25) (QUIRK *et al.*, 1984; JAFFÉ *et al.*, 1987; RIES-KAUTT und ALBRECHT, 1989; INNES *et al.*, 1997; FARRIMOND *et al.*, 2002; NEUNLIST *et al.*, 2002).



**Abbildung 5.25** Teilstrukturen der häufig in Sedimenten auftretenden *bishomo*-Hopansäure und des *bishomo*-Hopanols (VAN DORSSELAER *et al.*, 1977; OURISSON, 1986).

Bekannte thermodynamische Umwandlungen setzen z.B. an den Positionen C-17 und C-21 an, an denen in biogenen Hopanoiden Wasserstoffatome in  $\beta$ -Konfiguration gekoppelt sind (17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-Hopan). Mit zunehmender Reife der Sedimente kommt es zu Epimerisierungsreaktionen, die die Vorläufer in ihre 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)- bzw. 17 $\beta$ (H),21 $\alpha$ (H)-Diastereomere überführen (VAN DORSSELAER *et al.*, 1977; FARRIMOND *et al.*, 1998). Das Verhältnis der Diastereomere wird daher auch als Reifeindikator in thermodynamisch beeinflussten, organikreichen Sedimenten genutzt. Weiterhin bewirken diagenetische Modifikationen einen erhöhten Anteil der Hopanoide der ‚geologischen‘ S-Konfiguration am asymmetrischen C-22-Atom im Vergleich zu dem beispielsweise aus Bakterien bekannten ‚biologischen‘ 22R-Epimer (PETERS und MOLDOWAN, 1993).

Die Entdeckung des C<sub>35</sub>-Bakteriohopantetrols (Bakteriohopan-32,33,34,35-tetrol, BHT, Abb. 5.26a), eines Hopanoids mit einem Tetrahydroxypentylrest als Seitenkette in *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* (FÖRSTER *et al.*, 1973), sowie des Auftretens typisch bakterieller Hopanoide und ihrer diagenetischen Folgeprodukte in sehr jungen Sedimenten führte zu der Annahme des bakteriogenen Ursprungs der Geohopanoide (ROHMER *et al.*, 1980). Diverse weitere Hopanoide wurden in biologischen und geologischen Proben gesichtet, deren charakteristische Strukturmerkmale wie Methylverzweigungen an den Positionen 2 und 3 ihre Herkunft erkennen lassen. So wurden beispielsweise 2-Methylhopanpolyole mit hohen Gehalten in Kultivaten von Cyanobakterien festgestellt, während sich ihre defunktionalisierten Strukturäquivalente in bitumenhaltigen Ablagerungen wie z.B. den archaischen/frühproterozoischen (2,5 Mrd. J.) Schieferen des australischen Hamersley-Beckens fanden (SUMMONS *et al.*, 1999). Heute wird gemeinhin akzeptiert, dass viele Geohopanoide diagenetische Transformationsprodukte der Bakteriohopanoide sind (SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 1995; INNES *et al.*, 1997; FARRIMOND *et al.*, 2000; WATSON und FARRIMOND, 2000).

### Bakterien

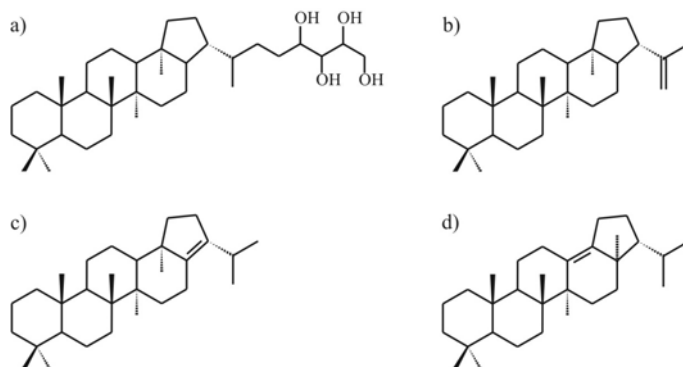
Den Geohopanoiden werden allgemein die direkten Biosynthese-Produkte, die Biohopanoide, gegenübergestellt (OURISSON und ROHMER, 1992). Neben Vertretern der Cyanobacteria sind in der Domäne der Bakterien Hopanoide in vielen aeroben bis mikroaerophilen Spezies zahlreicher Gram-positiver und Gram-negativer Taxa verbreitet (OURISSON *et al.*, 1979; ROHMER *et al.*, 1984; TAYLOR, 1984; LANGWORTHY und POND, 1986b; HERMANS *et al.*, 1991; ROHMER *et al.*, 1992; KANNENBERG *et al.*, 1995; CVEJIC *et al.*, 2000b; PORALLA *et al.*, 2000; DOUKA *et al.*, 2001). Zu diesen gehören zahlreiche Proteobakterien der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Klasse sowie einige Firmicutes und Actinobacteria.

Es hat sich gezeigt, dass Hopanoide kein universelles Merkmal eines Taxons sind, so dass sie als lipidchemischer Indikator spezifischer Bakteriengruppen nur eingeschränkt geeignet sind. Sehr vielfältig sind auch die ökologischen Funktionen der Produzenten, wenngleich viele eine chemoorganotrophe Ernährungsweise bevorzugen. Hopanoide sind beispielsweise für Essigsäurebildner (ROHMER *et al.*, 1984) und häufiger auch für methylotrophe (NEUNLIST und ROHMER, 1985b) sowie methanotrophe (JAHNKE *et al.*, 1995; JAHNKE *et al.*, 1999; CVEJIC *et al.*, 2000a) Bakterien dokumentiert. In CH<sub>4</sub>-assoziierten Depositionen finden sich aus diesem Grund häufig Hopanoide mit deutlicher <sup>13</sup>C-Abreicherung (THIEL *et al.*, 1999b; PANCOST *et al.*, 2000; HINRICHS, 2001; THIEL *et al.*, 2001; BURHAN *et al.*, 2002). Aber auch von autotrophen, N<sub>2</sub> umsetzenden Bakterien sind Hopanoide bekannt (OURISSON *et al.*, 1979; SEEMANN *et al.*, 1999; ROSA-PUTRA *et al.*, 2001). In Kulturen obligat anaerober Bakterien wie z.B. Sulfat reduzierender  $\delta$ -Proteobakterien sind hopanoide Strukturen noch nicht beobachtet worden und es wurde lange Zeit angenommen, dass diese Lipidklasse diagnostisch für aerobe Bakterien ist. Erst die Ergebnisse neuerer Arbeiten deuten auf die Genese von Hopanoiden in permanent anoxischen Biotopen hin (PANCOST *et al.*, 2000; THIEL *et al.*, 2001; THIEL *et al.*, 2003).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Auch bakterielle Hopanoide umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen, für die generell die Abstammung von Bakteriohopanpolyolen ( $\geq C_{35}$ ) angenommen wird (TALBOT *et al.*, 2001). Die Bakteriohopanpolyole setzen sich aus einer Vielzahl unterschiedlich funktionalisierter und teilweise hoch komplexer Moleküle zusammen, die als Gruppe die bakteriellen Hopanoide dominieren (NEUNLIST und ROHMER, 1985a; OURISSON, 1986; ROTH *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 1996; FARRIMOND *et al.*, 2000). In Bakterien werden unter den Bakteriohopanpolyolen oftmals vergleichsweise hohe Gehalte des BHT vorgefunden (Abb. 5.26a).

Neben den Bakteriohopanpolyolen sind einfacher strukturierte Verbindungen wie Diplopten (Hop-22(29)-ene,  $C_{30}$ , Abb. 5.26b), *bishomo*-Hopan-32-ol ( $C_{32}$ ) und Diplopterol (Hopan-22-ol,  $C_{30}$ ) in den meisten Hopanoidproduzenten beobachtet worden (ROHMER *et al.*, 1984; TAYLOR, 1984; ROHMER *et al.*, 1992; KANNENBERG und PORALLA, 1999). In Bakterien seltener auftretende Hopanoide sind Hop-17(21)-en (Abb. 5.26c), Neohop-13(18)-en (Abb. 5.26d) und Hopan (17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-Hopan) (DE ROSA *et al.*, 1973; DOUKA *et al.*, 2001; ROSA-PUTRA *et al.*, 2001).



**Abbildung 5.26** Strukturformeln ausgewählter bakterieller Hopanoide a) Bakteriohopanetetrol (BHT), b) Diplopten, c) Hop-17(21)-en und d) Neohop-13(18)-en.

Ferner sind auf vereinzelte Bakteriengruppen begrenzte Verbindungen mit hopanoidem Grundgerüst bekannt. So sind Hopanoide mit Methylierung an C-2 des Rings A im Wesentlichen von Cyanobakterien und untergeordnet von  $N_2$  fixierenden Vertretern der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien bekannt (VILCHEZE *et al.*, 1994; LLOPIZ *et al.*, 1996; SUMMONS *et al.*, 1999). 3-Methyl-Hopanoide sind für verschiedene Arten der  $\alpha$ -Proteobakterien-Gattung *Gluconacetobacter* (syn. *Acetobacter*) sowie für  $CH_4$  oxidierende  $\gamma$ -Proteobakterien wie *Methylobacterium organophilum*, *Methylococcus caspulus*, *Methylomonas methanica* und *Methylocaldum* spp. dokumentiert (ROHMER und OURISSON, 1976; NEUNLIST und ROHMER, 1985b; ZUNDEL und ROHMER, 1985b; a; SUMMONS *et al.*, 1994; CVEJIC *et al.*, 2000a).

In dem Actinobakterium *Frankia* sp. beobachteten ROSA-PUTRA *et al.* (2001) erstmals das primäre Auftreten von Hopanoiden mit der ‚geologischen‘ 17 $\beta$ (H),21 $\alpha$ (H)- und 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-Stereoisomerie in Bakterienisolaten. Von unserer Arbeitsgruppe wurde ferner das Vorkommen hoher Gehalte der 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure in einer metabolisch aktiven Mikroorganismenmatte der anoxischen Zone des Schwarzen Meers festgestellt (THIEL *et al.*, 2003). Die Ergebnisse beider Studien zeigen somit, dass auch in biologisch aktiven Bakterienzellen bzw. in der Biomasse von Mikroorganismengemeinschaften Hopanoide mit ‚geologischer‘ Stereoisomerie auftreten können.

Die Synthese von Hopanoiden durch Bakterien beruht, wie auch die Steroidsynthese, im Wesentlichen auf enzymatischen Cyclisierungsreaktionen des Triterpenoids Squalen (OURISSON *et al.*, 1979). Die räumlichen Dimensionen von Hopanoiden und der in Eukaryoten weit verbreiteten Steroide ähneln sich grundsätzlich und beiden Molekülstrukturen ist ein vergleichsweise planares und rigides Ringsystem gemein (ROHMER *et al.*, 1992). Diese strukturellen Charakteristika sowie Experimente mit biologischen Modelmembranen deuten darauf hin, dass Hopanoide Surrogate der Steroide sind (ROHMER *et al.*, 1984; OURISSON, 1987). Die Funktion der diversen Bakteriohopanoide ist zwar nicht geklärt, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass sie zur Regulation der Zytoplasmamembraneigenschaften beitragen (OURISSON und ROHMER, 1992; ROHMER *et al.*, 1992; KANNENBERG und PORALLA, 1999).

Extrazelluläre biologische Effekte von Hopanoiden sind bis jetzt wenig erforscht. Es wurde aber beispielsweise gezeigt, dass verschiedene Bakteriohopanpolyol-Derivate aus *Zymomonas mobilis* die Aktivität der Lipid degradierenden 15-Lipoxygenase von Sojabohnen beeinflussen können (MOREAU *et al.*, 1997) und dass *bishomo*-Hopan-32-ol zytotoxisch gegen spezifische Leukämiezellen wirkt (NAGUMO *et al.*, 1992).

### Schwämme

Das Vorkommen von Hopanoiden in Poriferen ist erst seit kurzem und lediglich durch wenige Studien dokumentiert. Mit BHT und dem bis dahin unbekanntem 12-Methyl-BHT aus dem karibischen homoscleromorphen *Plakortis simplex* wurde diese Lipidklasse erstmals von COSTANTINO *et al.* (2000) in Eukaryoten beschrieben. Während für das BHT eine prokaryotische Herkunft von assoziierten oder eingestrudelten Bakterien als sehr wahrscheinlich erscheint, diskutieren die Bearbeiter für das 12-Methyl-BHT die Methylierung durch den Schwamm analog den von Poriferen durchgeführten Modifikationen an aufgenommenen FA (DJERASSI und LAM, 1991) und Steroiden (KERR und BAKER, 1991; AIELLO *et al.*, 1999). SHATZ *et al.* (2000) isolierten mit dem Bakteriohopanhexol ebenfalls ein neues Hopanoid, vermutlich bakteriogenen Ursprungs, aus *Petrosia* sp. Für Kalt- oder Tiefwasserschwämmen sind pentacyclische Triterpenoide bis jetzt nicht beschrieben.

### Ergebnisse

In einzelnen von uns untersuchten Kaltwasser-Poriferen treten mehrere C<sub>30</sub>- und C<sub>32</sub>-Hopanoide frei in den Gesamtextrakten oder gebunden in der Fraktion transveresteter FA auf. Die Quantifizierung der Komponenten in den Gesamthydrolysaten aller Schwämme zeigte, dass 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure und die unfunktionalisierten, ungesättigten Neohop-13(18)-en und Diplopten gefolgt von Hop-17(21)-en quantitativ bedeutend sind (Tabelle 5.7). In *G. barretti*, in dessen KW- und ME-Fractionen im Vergleich zu anderen Schwämmen hohe Hopanoidgehalte festgestellt wurden, ist die 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure mit einem Anteil von 0,2 Gew.-% an der FAME-Fraktion vertreten.

Eine Reihe weiterer Komponenten hopanoider Struktur wurden in vereinzelt Poriferen in Spurenkonzentrationen beobachtet. Aufgrund ihrer geringen Relevanz im Probeninventar wurden diese Hopanoide nicht weiter betrachtet.

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

**Tabelle 5.7** Auftreten ausgewählter Hopanoide in den Schwämmen. Hopansäuren wurden als ME-Derivate gemessen.

Spezies	Hop-17(21)-en	Neohop-13(18)-en	Hop-22(29)-en ,Diplopten‘	17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)- <i>bishomo</i> -Hopansäure
<i>H</i> -unknown sp. 1			○	
<i>Sympagella</i> sp.			○	
<i>H</i> -unknown sp. 3			tr.	tr.
<i>H</i> -unknown sp. 6			tr.	
<i>H</i> -unknown sp. 8			○	
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	○	●	○	
<i>Plakortis</i> sp.	○	●	●	●●●
<i>Stryphnus ponderosus</i>				●●
<i>Dragmastra normanii</i>				●●
<i>Geodia barretti</i>		●	●	●●
<i>Geodia macandrewii</i>		○	○	●●
<i>Isops phlegraei</i>	○			●●
<i>Pachymatisma johnstonii</i>		○	○	
<i>Oceanapia robusta</i>	○	○		●
<i>Haliclona</i> sp. 1		○	○	●●
<i>Petrosia crassa</i>		○	○	●●
<i>Spongosorites genitrix</i>	○	○	○	●●

●●● = höchste Konzentrationen, ●● und ● = rel. hohe bzw. moderate Konzentrationen, ○ = geringe Konzentrationen, tr. = in Spurenkonzentrationen, kein Eintrag = nicht nachgewiesen.

Signifikante Gehalte unterschiedlicher Hopanoide wurden in einigen Demospongien verschiedener phylogenetischer Position und einem hexactinelliden Schwamm der Familie Hyalonematidae vorgefunden. Im Vergleich aller Schwämme treten das Diplopten und die 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure am häufigsten auf. In der Regel wird Diplopten von Neohop-13(18)-en in vergleichsweise geringerer Konzentration begleitet.

Für den tetractinomorphen Schwamm *Geodia macandrewii* wurden mögliche Bindungsformen der in der FAME-Fraktion nach Transveresterung festgestellten 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure überprüft. Die Untersuchung verschieden polarer Fraktionen der gesamtorganischen Extrakte erbrachte keinen Befund für die Gegenwart freier HopansäureME in Schwammgeweben. Nach Behandlung des gesamtorganischen Extrakts mit Diazomethan wurden allerdings 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-HopansäureME in deutlichen Konzentrationen vorgefunden. Wie ein Vergleich mit dem Gehalt im TMCS-Extrakt von *G. macandrewii* zeigte, wurden etwa 25 % der C<sub>32</sub>-Hopansäure zum ME-Derivat umgesetzt. Etwa 75 % der C<sub>32</sub>-Hopansäure gingen keine Reaktion mit Diazomethan ein.

In einigen Poriferen wurde 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopan-32-ol in signifikanten Gehalten beobachtet. Es ist anzunehmen, dass diese Komponente eine Nachfolgeverbindung von Bakteriohopanoiden wie z.B. des BHT oder anderen Hopanopolyolen ist. Der indirekte Nachweis komplexer hochmolekularer Bakteriohopanoide mit *vicinal* hydroxylierten Seitenketten wurde durch die Analyse degradiert Hopanole geführt. Hierzu wurden die gesamtorganischen Extrakte ausgewählter Schwämme mit verschiedenen dichten Bakterienpopulationen mit H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>/NaBH<sub>4</sub> behandelt, acetyliert, aufgereinigt und vermessen (s. Anh. Methodik). Zur Differenzierung zwischen originären und degradierten Hopanolen wurden Aliquots der gesamtorganischen Extrakte simultan acetyliert, gereinigt und analysiert.

In Tabelle 5.8 sind die Relativgehalte des 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopan-32-ols in gesamtorganischen Extrakten verschiedener Schwämme vor und nach Spaltung polyhydroxylierter Seitenketten komplexer Hopanpolyole aufgeführt.

**Tabelle 5.8** Auftreten gebundenen 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopan-32-ols in Poriferen nach Behandlung mit H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>/NaBH<sub>4</sub>.

Spezies	Gesamtorganischer Extrakt		Bakterienreichtum <sup>*)</sup>
	unbehandelt	nach H <sub>5</sub> IO <sub>6</sub> /NaBH <sub>4</sub>	
<i>Dragmastra normanii</i>	tr.	●●	✓
<i>Geodia macandrewii</i>		●	✓
<i>Isops phlegraei</i>		●●	✓
<i>Pachymatisma johnstonii</i>	tr.	●●	✓
<i>Mycale lingua</i>		tr.	
<i>Oceanapia robusta</i>		●	✓
<i>Haliclona</i> sp. 1	○	●	✓
<i>Phakellia robusta</i>		tr.	

●● = rel. hohe Konzentrationen, ● = moderate Konzentrationen, ○ = geringe Konzentrationen, tr. = in Spuren, kein Eintrag = nicht nachgewiesen; \*) s. Kapitel 5.1

Wie die Ergebnisse in Tabelle 5.8 zeigen, wurden nach der Behandlung mit H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>/NaBH<sub>4</sub> in den gesamtorganischen Extrakten aller untersuchten Schwämme relativ erhöhte Gehalte des 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopan-32-ols beobachtet. Nach der Spaltungsreaktion nahm diese Komponente in Individuen, für die keine freien Hopanole festgestellt wurden, beispielsweise 0,5 Gew.-% (*G. macandrewii*), 1,7 Gew.-% (*I. phlegraei*) und 0,6 Gew.-% (*O. robusta*) an der acetylierten Gesamtfraction ein. Auffallend ist, dass signifikante Mengen des C<sub>32</sub>-Hopan-32-ols vorrangig in Poriferen mit hoher Bakteriendichte freigesetzt wurden.

Für den direkten Nachweis des Vorläufermoleküls des Hopan-32-ols und weiterer hochmolekularer Bakteriohopanoide wurden die gesamtorganischen Extrakte von *Dragmastra normanii*, *Mycale lingua*, *Pachymatisma johnstonii*, *Haliclona* sp. 1 und *Phakellia robusta* acetyliert, gegen *n*-Hexan extrahiert und die Lipide mit einer vergleichsweise kurzen GC-Säule (15 m) getrennt. Zur Bestimmung der GC-Retentionszeit des BHT-Tetraacetats wurde eine authentische Standardkomponente (Prof. Dr. M. Rohmer, *Université Louis Pasteur, Strasbourg*) vermessen.

In den Fraktionen aller mit dieser Methode untersuchten Schwämme wurde ein komplexes Lipidgemisch festgestellt, das durch hohe Konzentrationen von Sterolen geprägt ist. BHT oder weitere Hopanpolyole wurden in den Extrakten jedoch nicht gefunden.

### Diskussion

Vornehmlich in bakterienreichen Poriferen wurden einige Hopanoide beobachtet, von denen freie C<sub>30</sub>-Hopanoidkohlenwasserstoffe und freie sowie gebundene, funktionalisierte C<sub>32</sub>-Komponenten hervortreten. Die gefundenen Hopanoid-KW, wie Hop-17(21)-en, Neohop-13(18)-en und Hop-22(29)-en, sind aufgrund ihres häufigen Auftretens in Bakterienisolaten auf den Eintrag durch SAB zurückzuführen. Da in den KW-Fractionen ausnahmslos Hopanoide mit 30 C-Atomen festgestellt wurden, ist zu vermuten, dass diese Lipide einem gemeinsamen Vorläufermolekül entstammen.

Einige Arbeiten an sedimentären Probenmaterialien zeigten, dass neben der bakteriellen Synthese auch diagenetische Umlagerungsreaktionen des Diploptens zur Bildung von Hop-17(21)-en und Neohop-13(18)-en führen (z.B. FARRIMOND und TELNÆS, 1996). In dieser Hinsicht ist es auffallend, dass die letztgenannten Hopanoide überwiegend in solchen Poriferen auftreten, die auch das Diplopten enthalten.

*Bishomo*-Hopansäure ist das dominante Hopanoid im Zellhydrolysat von *Bakterienschwämmen* und tritt mit der typischen ‚biologischen‘ 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-Konfiguration auf. Von dieser Komponente ist ebenso bekannt, dass sie in rezenten Sedimenten als frühdiagenetisches, oxidatives Degradationsprodukt höhermolekularer Hopanoide in freier Form vertreten ist (QUIRK *et al.*, 1984; RIES-KAUTT und ALBRECHT, 1989; PETERS und MOLDOWAN, 1991; INNES *et al.*, 1997; FARRIMOND *et al.*, 2002). Eine Bindung in komplexen Biohopanoiden sowie eine *de-novo*-Biosynthese durch Bakterien ist dagegen für Hopansäuren nicht eindeutig belegt. Aus der Beobachtung steigender Konzentration ungebundener C<sub>30</sub>- bis C<sub>32</sub>-Hopansäuren der  $\beta\beta$ -Konfiguration mit zunehmendem Grad der Biodegradation verschiedener Rohöle folgerten MEREDITH *et al.* (2000), dass die Verbindungen bakteriellen Ursprungs sind. NARAOKA *et al.* (2000) fanden nach der Hydrolyse rezenter Sedimente im Vergleich zu Diplopten deutlich gestiegene Konzentrationen der 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure und vermuteten, dass diese im Hinblick auf relativ erhöhte <sup>13</sup>C-Gehalte heterotrophen Bakterien entstammt.

Aufgrund dieser Beobachtungen und dem Fehlen weiterer diagenetisch modifizierter Hopanoide, die auf einen exogenen Eintrag schließen lassen, ist in dem untersuchten Probenmaterial das auf *Bakterienschwämme* begrenzte Auftreten von 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure mit deutlichen Konzentrationen interessant. Für den Demospongiae *Geodia macandrewii* wurde gezeigt, dass ein Anteil von mindestens 25 % der 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure ungebunden im organischen Extrakt vorliegt. Mögliche Vorläuferkomponenten, aus denen weitere Anteile (75 %) der Hopansäure mittels saurer Hydrolyse generiert wurden, sind in dieser Arbeit nicht aufgeklärt worden. Daher scheint für große Teile der 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure die Bindung durch adsorptive Wechselwirkungen an eine unbekannte Matrix oder ein physikalischer Einschluss in Makromoleküle als wahrscheinlich. Die 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopansäure in freier Form kann als frühdiagenetisches Abbau- und möglicherweise als Akkumulationsprodukt im Gewebe von bakterienreichen Schwämmen interpretiert werden.

Freie Hopanoidalkohole in den gesamtorganischen Extrakten treten mit dem 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopan-32-ol mit geringen Gehalten lediglich in drei Individuen auf. Interessanterweise wurde das von zahlreichen Bakterien in bedeutenden Konzentrationen synthetisierte Diplopterol (ROHMER *et al.*, 1984) in keinem der untersuchten Schwämme festgestellt. Die Beobachtung vergleichsweise erhöhter Konzentrationen des 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopan-32-ols nach Degradation von Hopanpolyol-Seitenketten mit *vicinalen* Hydroxylgruppen zeigt die Präsenz höhermolekularer polyfunktionalisierter Hopanoide in bakterienreichen Schwämmen. Die Struktur(en) vermuteter Vorläufermoleküle des C<sub>32</sub>-Hopanols konnten jedoch auch mit einer auf die Analyse individueller Bakteriohopanpolyole ausgerichteten GC-MS-Konfiguration, mit der z.B. das BHT erfasst wird, nicht geklärt werden. Es muss daher vermutet werden, dass das 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-*bishomo*-Hopanol komplexeren Molekülen, wie z.B. dem von SHATZ *et al.* (2000)



für *Petrosia* sp. beschriebenen Bakteriohopanhexol, entstammt, die sich unter den gewählten Bedingungen der Analyse entziehen.

Die Verteilung der verschiedenen dominanten Hopanoidspezies in dem Probeninventar deutet in jedem Fall darauf hin, dass Hopanoide von SAB synthetisiert werden. Verbindungen hopanoider Strukturen wurden vornehmlich in Schwämmen beobachtet, die weitere Bakterienbiomarker wie z.B. mittkettig verzweigte SCFA, Dicarbonsäuren oder Monoalkylglycerolether in hohen Konzentrationen enthalten. Aufgrund vergleichsweise geringer Gehalte pentacyclischer Triterpenoide ist anzunehmen, dass die Hopanoidproduzenten entweder nur geringe Gehalte dieser Lipidklasse produzieren oder eine untergeordnete Rolle in der SAB-Gemeinschaft spielen. Dennoch wurden in dieser Arbeit erstmals Hopanoide von SAB-Gemeinschaften mehrerer Kaltwasserporiferen dokumentiert.

## 5.5 Gattung *Geodia* – Zusammenhang zwischen der Mikrobiologie, den ökologischen Parametern und der Verteilung bakterieller Fettsäuren in *Bakterienschwämmen*

Für eine detaillierte Analyse der Verteilung von Bakterienkomponenten in Schwämmen wurde *Geodia barretti* (Bowerbank, 1858) als bakterienreiches Exemplar ausgewählt. Besonderes Interesse gilt hier den Strukturisomeren der mcb-SCFA, die in vielen der untersuchten Poriferen als Hauptkomponenten auftreten (THIEL *et al.*, 2002). Wenngleich komplexe Isomergemische dieser Komponenten von keinem Organismus bekannt sind, legt doch das begrenzte Auftreten einzelner mcb-SCFA in Angehörigen der Actinobacteria und Sulfat reduzierender  $\delta$ -Proteobacteria die Vermutung nahe, dass die beobachteten Komponenten bakteriogen sind. Um Hinweise auf die Produzenten der Isomergemische zu erhalten, werden nachfolgend die Merkmale der mcb-SCFA in *G. barretti* eingehend betrachtet.

Die Familie der Geodiidae ist durch Fossilfunde seit dem Kambrium nachgewiesen (GRUBER und REITNER, 1991) und tritt rezent mit mehreren Gattungen häufig im nordostatlantischen Raum, wie z.B. am Sula-Rücken, auf. Die Geodiidae zeichnen sich generell durch eine mehr oder minder globuläre Form mit üblichen Ausmaßen von mehreren Dezimetern aus (Abb. 5.27).



*G. barretti* besitzt eine relativ feste Außenschicht, die Kortex, die durch eine dichte Packung von Mikroskleren aufgebaut ist (s. Abb. 5.32). Bekannt ist, dass der Schwamm in der intrazellulären Matrix eine dichte Population assoziierter Mikroorganismen beherbergt.

Mit Hilfe histologischer, mikro- und molekularbiologischer sowie organisch-chemischer Methoden wurde *G. barretti* im Rahmen des Projektes BOSMAN eingehend untersucht. Die Struktur des quantitativ hervortretenden, als ‚Barretin‘ bezeichneten Sekundärmetaboliten, dessen Produzenten bis jetzt nicht bekannt sind, wurde vor kurzem aufgeklärt (SÖLTER *et al.*, 2002).

**Abbildung 5.27** *Geodia barretti*, geborgen im Korsfjord, Norwegen (Bildmaterial: I. Kaesler).

### 5.5.1 Phylogenie der Bakterien in *G. barretti* – Synopse lipidchemischer und mikrobiologischer Untersuchungen

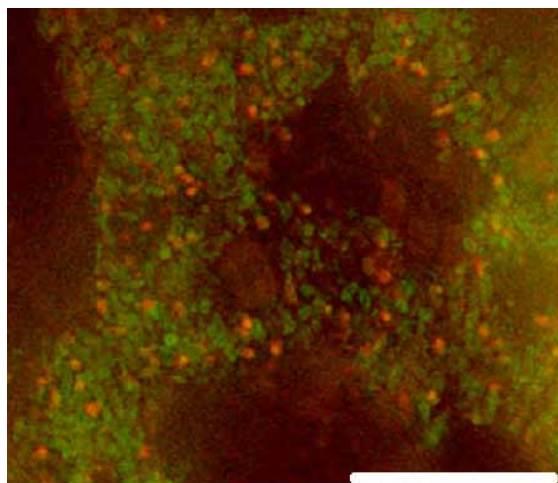
Aufgrund einer mit den Isolierungs- und Anreicherungsarbeiten verbundenen Selektion lässt die Zusammensetzung von Bakterienkultivaten aus Poriferen generell nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die phylogenetische Struktur der Bakterienpopulation im Gewebe zu (s. Kapitel 4). Von den Mitarbeitern der Mikrobiologie im Projekt BOSMAN sind aus diesem Grund weitere Methoden zur phylogenetischen Klassifizierung der Bakteriengemeinschaft in *G. barretti* eingesetzt worden. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeiten für die anschließende Diskussion mutmaßlicher Produzenten der mcb-SCFA berücksichtigt werden.

Von Mitarbeitern der AG Szewzyk wurden aus *G. barretti* etwa 90 Bakterienklone (Klonierung der 16S-rDNA) durch Sequenzierung analysiert. Die vorläufige Einordnung dieser Klone in den phylogenetischen Baum zeigt die geringsten phylogenetischen Distanzen zu Vertretern der Chloroflexi, der Thermomicrobia, der Actinobacteria, der Acidobacteria, der Nitrospirae, der Nitrospina sowie der  $\alpha$ -, der  $\gamma$ - und der  $\delta$ -Proteobacteria (pers. Mitteilung I. Kaesler, Stand 09/2003). Klone mit phylogenetischer Zuordnung zu den Acidobacteria und den Thermomicrobia sind am häufigsten vertreten. Angehörige der genannten Phyla sind mit Ausnahme der Thermomicrobia bereits für andere Schwämme dokumentiert (vgl. Kapitel 2.5.1).

Die Verteilung verschiedener Bakteriengruppen im Gewebe von *G. barretti* wurden von HOFFMANN (2003) mit mikroskopischen Methoden, bei denen unter anderem DAPI-Färbungen sowie Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) kombiniert wurden, untersucht. Für die FISH-Experimente wurden gruppenspezifische Sonden für Archaeen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien sowie verschiedene auf Speziesebene wirksame Sonden für Sulfat reduzierende Bakterien (SRB) der  $\delta$ -Proteobacteria eingesetzt (Abb. 5.28).

Die Ergebnisse dieser Studie deuten auf die Dominanz von  $\alpha$ -Proteobacteria (schätzungsweise > 50 %), gefolgt von  $\gamma$ -Proteobacteria (8,5 % ausgezählt), der Bakterienzellen hin. Archaeen und  $\beta$ -Proteobakterien wurden dagegen in *G. barretti* nicht gefunden. Die beobachteten SRB nehmen einen Anteil von 7,6 % der Bakterienzellen im Gewebe von *G. barretti* ein und setzen sich aus *Desulfovibrio* spp. (5,7 %) sowie Spezies der Gattungen *Desulfoarculus*, *Desulfomonile* bzw. *Synthrophus* (1,8 % insgesamt) zusammen.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen an *G. barretti* weisen auf eine heterogen zusammengesetzte Bakteriengemeinschaft hin. Bei beiden Untersuchungen wurden  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien in deutlichen Anteilen nachgewiesen.



**Abbildung 5.28** *In-situ*-Aufnahme von SAB mit Fluoreszenz-markierten rRNA-spezifischen Oligonukleotid-Sonden im Gewebe von *G. barretti* (HOFFMANN, 2003). Eingesetzte Sonden: Eubacteria (in grün): EUB338; Sulfatreduzierer der Gattung *Desulfovibrio* (in orange): DSV698. Maßstab = 20  $\mu$ m.

Andere Prokaryotagruppen wie z.B. die  $\beta$ -Proteobakterien und auch Archaeen wurden mit beiden Methoden nicht beobachtet. Wie erwähnt sind bezüglich bekannter Produzenten von mcb-SCFA sowohl SRB als auch Actinobacteria von besonderem Interesse für diese Arbeit. Jeweils eine dieser Gruppen wurde mit den oben genannten mikrobiologischen Methoden identifiziert. Der Vergleich des Anteils der SRB an den SAB (7,6 %, HOFFMANN, 2003) mit dem Anteil der mcb-SCFA an kurzkettigen, potenziellen Bakterien-FA (24,4 %) in *G. barretti* zeigt, dass mcb-SCFA nicht den identifizierten SRB entstammen.

Als weiteren Hinweis, dass diese Gruppen nicht an der Produktion der mcb-SCFA beteiligt sind, können ferner frühere Befunde von Lipidbiomarkeranalysen herangezogen werden, bei denen mittkettig methylierte FA in Kulturen der Desulfovibrionales, der Desulfoarculaceae und der *Desulfomonile* in signifikanten Konzentrationen fehlten (vgl. Kapitel 5.1.5; BOON *et al.*, 1977; UEKI und SUTO, 1979; PARKES und TAYLOR, 1983; KOHRING *et al.*, 1994). Lediglich in *Desulfobacter* sp., einer Gattung der Desulfobacterales, die als Ordnung auch die in *G. barretti* beobachteten *Desulfoarculus* spp. umfasst, wurden mcb-SCFA in Form der 10-Me-C<sub>16:0</sub> mit deutlichen Anteilen (bis zu 16,5 %) an der FA-Fraktion beobachtet (TAYLOR und PARKES, 1983; VAINSHEIN *et al.*, 1992; CASTRO *et al.*, 2000).

### 5.5.2 Mittkettig methylverzweigte SCFA als Vorläuferkomponenten von mcb-,demospongiac acids‘?

#### 5.5.2.1 Auftreten spezifischer mcb-FA

Neben einer Reihe typischer Bakterienkomponenten zeichnet sich *G. barretti* durch verschiedene LCFA aus (BLUMENBERG, 2003), die aufgrund ihrer speziellen Struktur vielfach den ‚demospongiac acids‘ zuzurechnen sind (JEFFERTS *et al.*, 1974; LITCHFIELD und MORALES, 1976). Inkorporationsexperimente mit radioaktiv markierten Substanzen wiesen nach, dass die Synthese von ‚demospongiac acids‘ auf eine von der  $\Delta$ -Seite der FA greifenden C<sub>2</sub>-Elongation von potenziellen Bakterien-SCFA zurückzuführen ist (CARBALLEIRA *et al.*, 1986; RAEDERSTORFF *et al.*, 1987; HAHN *et al.*, 1988). In mehreren Studien unterschiedlich strukturierter ‚demospongiac acids‘ wurde gezeigt, dass individuelle Teilstrukturen der Ausgangsverbindungen bei der Verlängerung erhalten bleiben (LITCHFIELD und MARCANTONIO, 1978; WALKUP *et al.*, 1981; AYANOGLU *et al.*, 1982; RAEDERSTORFF *et al.*, 1987; CARBALLEIRA und REYES, 1990; DJERASSI und LAM, 1991).

Um einen möglichen Einbau von mcb-SCFA in ‚demospongiac acids‘ zu kennzeichnen, wurden die LCFA in *G. barretti* auf mittkettig methylverzweigte Strukturen überprüft. Auf Grundlage genannter Beobachtungen wurde vorausgesetzt, dass auf mcb-SCFA basierende mcb-LCFA anhand der Positionen der Methylverzweigung erkennbar sind. Ebenso wie ihre kurzkettigen Homologe können mcb-LCFA anhand ihrer relativen GC-Retentionszeiten und ihrer MS-Fragmentmuster, die für die Position der Methylverzweigungen diagnostische Fragmente aufweisen, identifiziert werden. In Abb. 5.29 ist das Gaschromatogramm der FA-Fraktion aus *G. barretti* gezeigt.

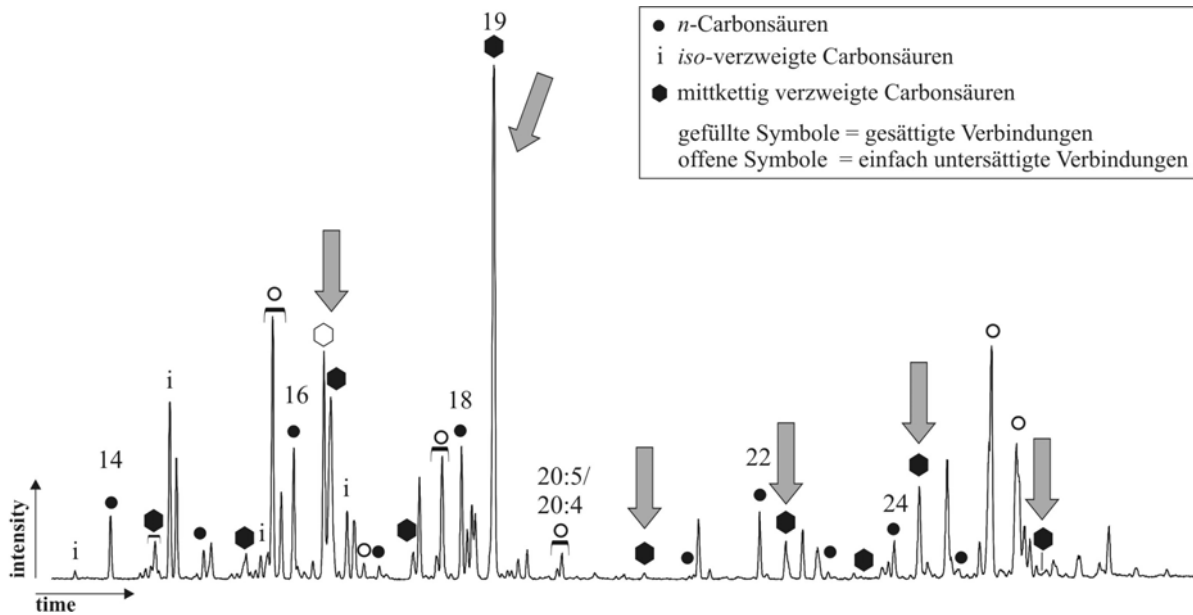


Abbildung 5.29 Partielles Gaschromatogramm der FAME in *G. barretti*. Ungeradzahlige mcb-FA sind mit Pfeilen markiert.

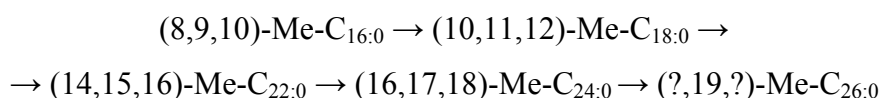
In *G. barretti* treten mcb-LCFA mit 21 bis 27 C-Atomen auf. Wie aus Abb. 5.29 erkennbar, sind lediglich ungeradzahlige mcb-LCFA vertreten. Die GC-Peaks der mcb-LCFA resultieren aus bis zu drei Strukturisomeren, die sich in der Position ihrer Methylverzweigung unterscheiden. Die Strukturisomere lassen sich mit den gewählten gaschromatographischen Bedingungen nicht auftrennen, sind aber anhand indikativer Fragmentationen erkennbar (THIEL *et al.*, 1999a). Die in *G. barretti* vorgefundenen Strukturisomere gesättigter mcb-FA sowie ihre Anteile an der Gesamtfraktion des zentralen Mesohyls sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Tabelle 5.9 Auftreten methylverzweigter FA in *G. barretti*.

Fettsäure	Δ-Position der Methylverzweigung												Gew.-%
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Me-C <sub>14:0</sub>													0,9
Me-C <sub>15:0</sub>													0,8
Me-C <sub>16:0</sub>													5,9
Me-C <sub>17:0</sub>													0,6
Me-C <sub>18:0</sub>													13,1
Me-C <sub>19:0</sub>			n.b.	n.b.	n.b.	n.b.							0,1
Me-C <sub>20:0</sub>						n.b.	n.b.						0,2
Me-C <sub>21:0</sub>													n.d.
Me-C <sub>22:0</sub>													1,1
Me-C <sub>23:0</sub>										n.b.	n.b.	n.b.	0,1
Me-C <sub>24:0</sub>													2,2
Me-C <sub>25:0</sub>													n.d.
Me-C <sub>26:0</sub>													0,2
Me-C <sub>26:2</sub>													n.d.
Me-C <sub>27:0</sub>													n.d.

n.b. = nicht bestimmt

In Kapitel 5.1.5 wurde gezeigt, dass das Gemisch der 10-, 11- und 12-Methyl-C<sub>18:0</sub> die Hauptkomponenten der FA-Fraktion in *G. barretti* stellt. Unter den mcb-LCFA sind quantitativ die mittkettig methylverzweigten Isomere der C<sub>22:0</sub> und der C<sub>24:0</sub> hervortretend. Während die mcb-C<sub>22:0</sub> und mcb-C<sub>24:0</sub> mit verschiedenen Strukturisomeren vertreten sind, wurde für die gering konzentrierten mcb-C<sub>20:0</sub> und mcb-C<sub>26:0</sub> nur einzelne Isomere beobachtet. Tabelle 5.9 zeigt ferner, dass grundsätzlich die Positionen der Methylverzweigungen zwischen ω4 und ω8 lokalisiert sind, also mit zunehmender Kettenlänge von der funktionellen Gruppe entfernt positioniert sind. Das Fehlen geradzahligter mcb-LCFA sowie die Signifikanz spezifischer Strukturisomere ungeradzahligter Vertreter dieser Substanzklasse führen zu der Annahme, dass in diesem Fall die Präsenz von mcb-LCFA auf folgendem Syntheseweg beruht:



Es ist daher wahrscheinlich, dass mit *G. barretti* vergesellschaftete Bakterien Vorläuferverbindungen für die schwammeigene Lipidsynthese zur Verfügung stellen.

### 5.5.2.2 Signaturen stabiler Kohlenstoffisotope ausgewählter Fettsäuren

Die isotopische Zusammensetzung einer Lipidverbindung gibt Hinweise auf die C-Quelle und die metabolischen Fertigkeiten eines Organismus. So sind viele Mikroorganismen zur bevorzugten Aufnahme und Umsetzung des isotopisch leichteren C-Isotops befähigt. Basierend auf der Isotopenkomposition des organischen Substrats führt die mit der Stoffwechselfähigkeit verbundene Fraktionierung zu einer diagnostischen Isotopensignatur der Zielkomponente.

Um Hinweise zu den Biosynthesewegen ausgewählter Bakterienpopulationen in *Bacteriosponges* zu erhalten, wurden die einzelnen SCFA der FA-Fraktion von *G. barretti* auf ihre Verhältnisse stabiler C-Isotope vermessen. In Tabelle 5.10 sind die δ<sup>13</sup>C-Werte ausgewählter FA bakterieller und eukaryotischer Herkunft in *G. barretti* aufgeführt.

**Tabelle 5.10** δ<sup>13</sup>C-Werte von Carbonsäuren im zentralen Gewebe von *G. barretti*.

Fettsäure	δ <sup>13</sup> C [‰]	Quelle
<i>n</i> -C <sub>14:0</sub>	- 15,5	Bakterien und Eukaryoten
<i>i</i> -C <sub>15:0</sub>	- 17,3	Bakterien (vorwiegend Gram-positiv)
<i>ai</i> -C <sub>15:0</sub>	- 17,3	Bakterien (vorwiegend Gram-positiv)
<i>i</i> -C <sub>16:0</sub>	- 16,1	Bakterien (vorwiegend Gram-positiv)
C <sub>16:1</sub> Δ <sup>9</sup>	- 16,8	Bakterien (Gram-negativ) und Eukaryoten
<i>n</i> -C <sub>16:0</sub>	- 16,9	Bakterien (Gram-negativ) und Eukaryoten
C <sub>18:1</sub> Δ <sup>9</sup>	- 11,4	vorwiegend Eukaryoten
C <sub>18:1</sub> Δ <sup>11</sup>	- 17,0	vorwiegend Bakterien (Gram-negativ)
mcb-C <sub>19:1</sub>	- 13,2	Bakterien
mcb-C <sub>19:0</sub>	- 14,5	Bakterien
mcb-C <sub>27</sub> Δ <sup>5,9</sup>	- 17,8	Schwamm
<i>i</i> -C <sub>27</sub> Δ <sup>5,9</sup>	- 20,7	Schwamm
<i>ai</i> -C <sub>27</sub> Δ <sup>5,9</sup>	- 21,9	Schwamm

Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ausgewählter Lipide in *G. barretti* sind im Hinblick auf ihre mutmaßlichen Produzenten sehr ähnlich. Dennoch können die Verbindungen hinsichtlich ihrer Isotopensignatur wahrscheinlichen Quellorganismen zugeordnet werden, da höhermolekulare Schwammlipide in Bezug zu den aus Bakterien bekannten Vorläuferkomponenten um mindestens 3 ‰ an  $^{13}\text{C}$  angereichert sind.

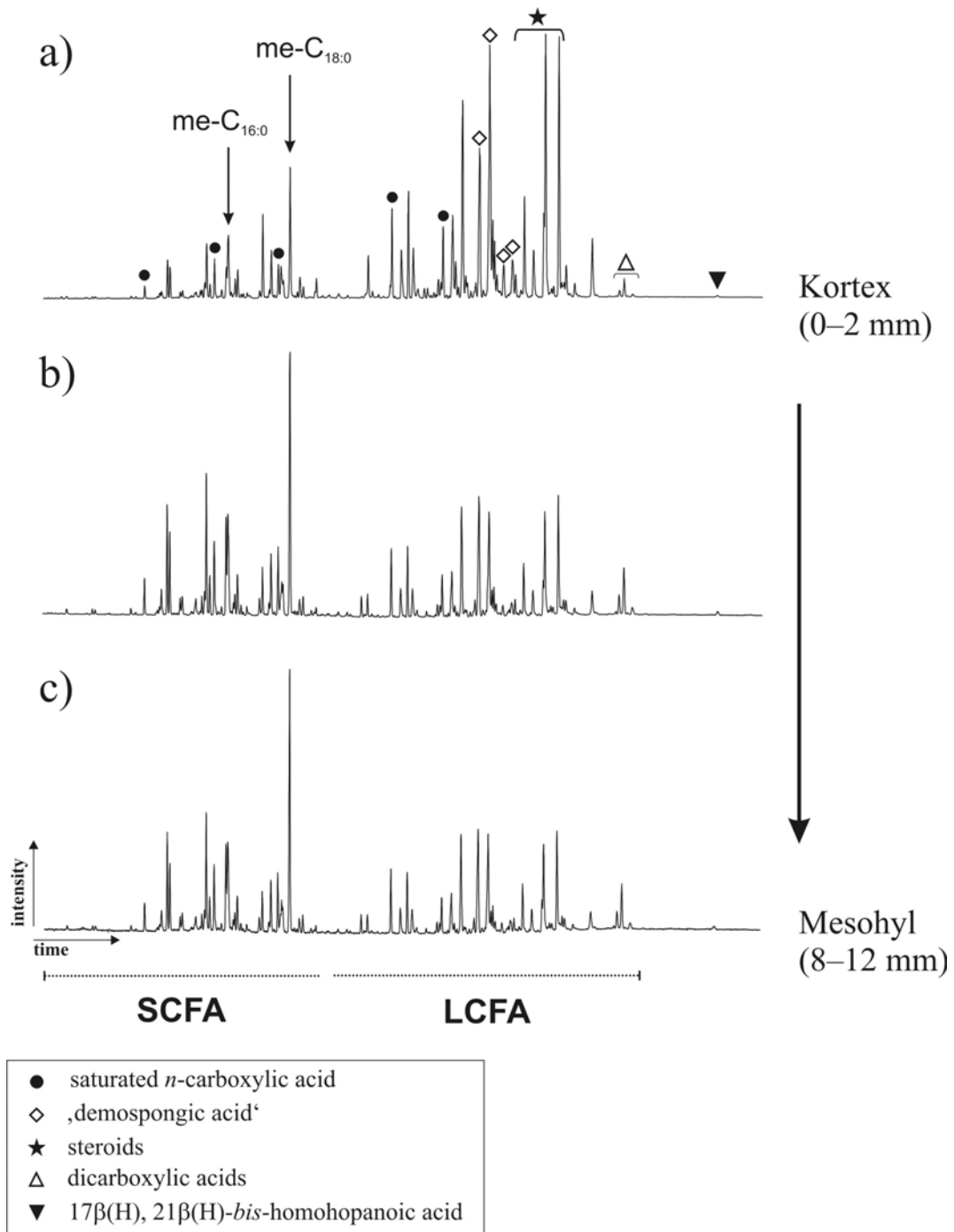
Unter den SCFA sind die Strukturisomere der gesättigten und einfach ungesättigten mittkettig methylverzweigten Octadecansäure, neben der  $\text{C}_{18:1}\Delta^9$ , am wenigsten an  $^{13}\text{C}$  angereichert. Die in Relation zu den anderen Markerverbindungen Gram-positiver und -negativer Bakterien deutlich schwereren Isotopenwerte der mcb-SCFA können mit einer isotopisch schwereren C-Quelle und/oder einer anders gearteten Fraktionierungsleistung ihrer Produzenten gegenüber den weiteren SAB erklärt werden. Ein Vergleich der Isotopensignaturen der mcb-FA und endständig verzweigten LCFA zeigt, dass diese Differenz auch nach der  $\text{C}_2$ -Elongation erhalten bleibt.

### 5.5.3 Zusammenhang zwischen der mcb-SCFA-Verteilung und den $\text{O}_2$ -Gehalten im Gewebe von *G. barretti*

Hinweise auf die metabolischen Fertigkeiten der mcb-Produzenten wurden durch die Bestimmung der räumlichen Verteilung der mcb-SCFA und durch Messung von Sauerstoffprofilen im Gewebe von *G. barretti* gewonnen. Um die räumliche Verteilung der mcb-SCFA im Körper von *G. barretti* zu analysieren, wurden drei Gewebestücke in einem von der Kortex zum zentralen Bereich gerichteten Profil eines vergleichsweise voluminösen Exemplares entnommen. Die Proben enthielten folgende Gewebestücke, die der üblichen Transveresterung (TMCS) zugeführt wurden:

Probe	Distanz von der Kortex [mm]
Kortex	0 bis 2
,subkortikales Mesohyl‘	> 2 bis 5
inneres Mesohyl	8 bis 12

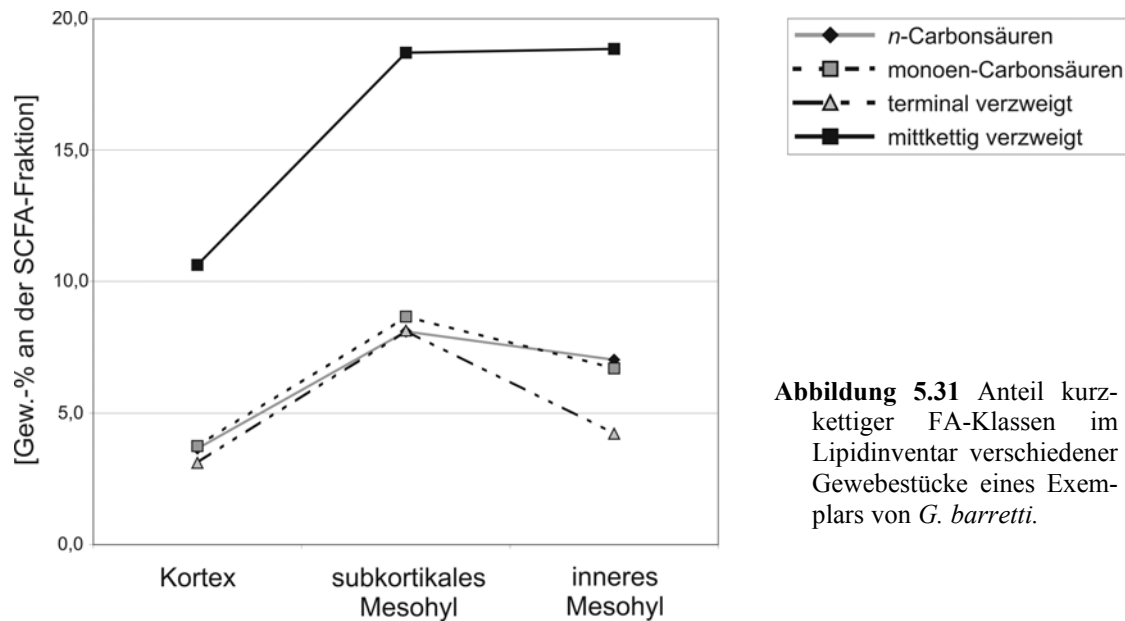
Die Verteilung der umgesetzten und extrahierten Verbindungen in den jeweiligen Gewebestücken ist in Abb. 5.30 dargestellt.



**Abbildung 5.30** Partielle Gaschromatogramme der FAME aus a) der Kortex, b) dem subkortikalen Mesohyl und c) dem inneren Mesohyl von *G. barretti*.

Anhand der Gaschromatogramme in Abb. 5.30 ist erkennbar, dass in *G. barretti* der Anteil der SCFA tendenziell gegenüber dem Anteil der LCFA mit zunehmendem Abstand von der Kortex im Bereich zwischen 0 und etwa 12 mm zunimmt. In einer Distanz von 8 bis 12 mm von der Kortex ähnelt das Lipidprofil dem des zentralen Mesohyls (Abb. 5.29). Für eine statistische Betrachtung wurden die relativen Anteile der verschiedenen Klassen der SCFA am Gesamtinventar in den Gewebestücken erfasst (Abb. 5.31).





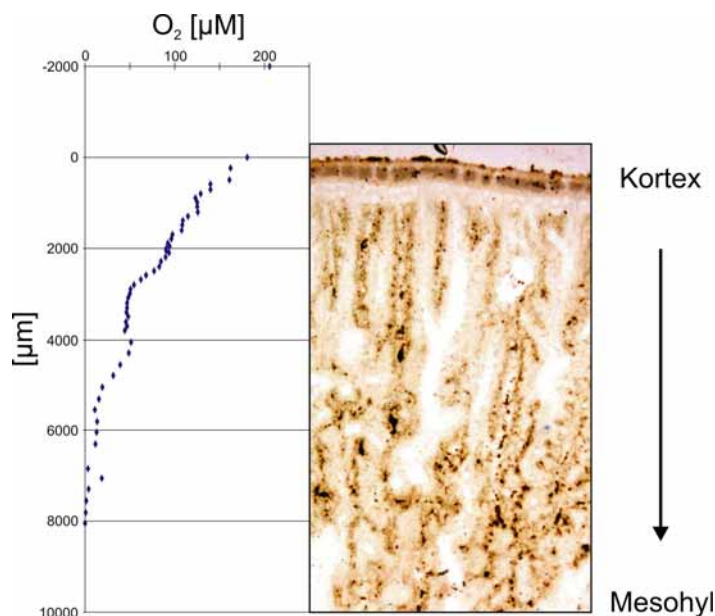
**Abbildung 5.31** Anteil kurz-kettiger FA-Klassen im Lipidinventar verschiedener Gewebestücke eines Exemplars von *G. barretti*.

Aus Abb. 5.31 ist ersichtlich, dass die Anteile verschiedener SCFA-Klassen in der Kortex bis in eine Tiefe von 0,5 mm im Gewebe von *G. barretti* zunehmen. Höchste Gehalte wurden in allen Gewebestücken für die mcb-SCFA gemessen. Mit zunehmender Distanz von der Kortex folgen die Anteile der Klassen unterschiedlichen Verläufen. Während sowohl mono-en- als auch terminal verzweigte SCFA im zentralen Mesohyl anteilig deutlich geringer vertreten sind als im subkortikalen Mesohyl, wurde für *n*-FA nur ein geringfügig kleinerer Anteil beobachtet. Nahezu gleiche Anteile im subkortikalen und inneren Mesohyl lagen dagegen für die mcb-SCFA vor.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass in der Kortex von *G. barretti* eine relativ geringe Bakteriendichte vorliegt. In den der Kortex anliegenden Mesohylteilen liegt hingegen ein signifikant erhöhter Anteil an Bakterienkomponenten vor, der mit zunehmender Distanz geringfügig abnimmt. Die quantitative Verteilung der Substanzklassen zeigt, dass die beiden unterschiedlichen Bereiche des Schwammgewebes von verschieden zusammengesetzten Bakterienpopulationen besiedelt werden, die generell von Produzenten der mcb-SCFA dominiert werden.

Die Gehalte freien Sauerstoffs im Gewebe von *G. barretti* wurden mit Hilfe von O<sub>2</sub>-Mikroelektroden in Phasen des aktiven Pumpens verschiedener Schwammexemplare aufgenommen (HOFFMANN, 2003). Die Ergebnisse einer O<sub>2</sub>-Messreihen sowie die mikroskopische Aufnahme eines entsprechenden Gewebeschnittes sind in Abb. 5.32 dargestellt.

Die Untersuchung der  $O_2$ -Verteilung im Gewebe von *G. barretti* erwies eine gute bis mäßige Durchlüftung der Kortex und des subkortikalen Bereichs während der Pumpaktivität (HOFFMANN, 2003). Mit zunehmender Tiefe nahm der  $O_2$ -Gehalt stetig ab und in einer Distanz von etwa 0,8 cm von der Kortex war kein freies  $O_2$  messbar. In Phasen ohne erkennbare Pumpaktivität wurden generell geringere  $O_2$ -Gehalte im Profil gemessen (Daten hier nicht gezeigt).



**Abbildung 5.32**  $O_2$ -Profil und mikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnitts senkrecht zur Kortex von *G. barretti* („Sponge 2“) (leicht verändert nach HOFFMANN, 2003).

### Diskussion

Das Auftreten diskreter Isomere gesättigter und einfach ungesättigter mittkettig methylverzweigter FA ist in einigen Studien an Schwämmen meist temperierter Flachwasserhabitate beschrieben (WALKUP *et al.*, 1981; DASGUPTA *et al.*, 1984; CARBALLEIRA und MALDONADO, 1988; CARBALLEIRA und REYES, 1990; DUQUE *et al.*, 1993; BARNATHAN *et al.*, 1994; GARSON *et al.*, 1994; CARBALLEIRA *et al.*, 1998b). Die ersten Berichte von Isomerenmischungen der mcb-FA als hervortretende Membranlipidbestandteile, wie sie hier in allen bakterienreichen Schwämmen angetroffen worden sind, erfolgten für verschiedene Schwämme des Great-Barrier-Reefs und dem mediterranen *Agelas oroides* (GILLAN *et al.*, 1988; THIEL *et al.*, 1999a). In beiden Studien vermuten die Bearbeiter spezifische bakterielle Demospongiae-Symbionten als Quellorganismen der mcb-FA.

Einzelne Isomere der mcb-SCFA treten nur in wenigen Bakterientaxa in signifikanten Konzentrationen auf, so dass sie als Biomarker für diese Gruppen von hoher Bedeutung sind. In vielen Studien wurde die bevorzugte Synthese der 10-Me- $C_{16:0}$  durch *Desulfobacter* spp. festgestellt (TAYLOR und PARKES, 1983; DOWLING *et al.*, 1988; VAINSHTEIN *et al.*, 1992). Untergeordnet wurde die 10-Me- $C_{16:0}$  aber auch in verschiedenen Actinobakterien (BALLIO und BARCELONA, 1971; LECHEVALIER, 1977; BALKWILL *et al.*, 1998) und weiteren Proteobakterien, wie *Agrobacterium tumefaciens* ( $\alpha$ -Klasse), sowie einigen Pseudoalteromonadales- und *Marinobacter*-Arten ( $\gamma$ -Klasse), festgestellt (diese Studie Kapitel 4).

In Actinomycetes-Arten wie *Mycobacterium (tuberculosis)*, *Streptomyces* sp., *Nocardiopsis* sp., oder *Corynebacterium* sp. findet sich im Wesentlichen die 10-Me- $C_{18:0}$  (JULÁK *et al.*, 1980; BRENNAN, 1988; SPRINGER *et al.*, 1995; TORKKO *et al.*, 2002).

Mehrere mcb-SCFA mit 17 bis 21 C-Atomen und der 12-Me- $C_{18:0}$  als Hauptkomponente methylverzweigter FA sind von POND *et al.* (1986) für den aeroben thermophilen *Thermomicrobium roseum* dokumentiert. Diverse einfach ungesättigte mcb-SCFA, wie sie hier ebenfalls in bakterien-

reichen Poriferen festgestellt wurden, sind beispielsweise aus  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien (GERSON *et al.*, 1974; GUCKERT *et al.*, 1986; BRENNER *et al.*, 1991; ROWE *et al.*, 2000) und Angehörigen der Actinomycetales (NIEPEL, 1999) bekannt.

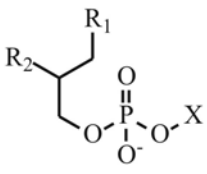
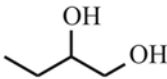
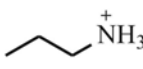
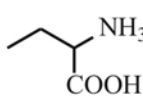
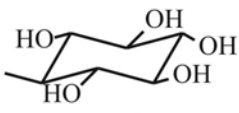
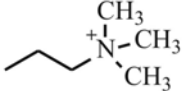
Bei einem interessanten Experiment beobachteten DOUMENQ *et al.* (1999), dass die 10-Me-C<sub>16:0</sub> ebenso vom fakultativ anaeroben  $\gamma$ -Proteobakterium *Pseudomonas nautica* synthetisiert wird, wenn lediglich *n*-Eicosan als C-Quelle zur Verfügung steht. In Erweiterung dieser Studie wurde eine aerobe Bakterienpopulation, die sich aus Arten der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien zusammensetzte, auf verschiedenen Medien kultiviert. Hierbei wurde ein gemeinsames Auftreten verschiedener mittkettig methylverzweigter C<sub>15</sub>- bis C<sub>17</sub>-FA nur bei der Zugabe von Petroleum als C-Quelle festgestellt (ARIES *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen geben Grund zu der Vermutung, dass zur Stimulierung der bakteriellen Synthese von mcb-SCFA spezifische Kulturbedingungen angesetzt werden müssen.

Für die mcb-SCFA, die vornehmlich in kompakt strukturierten Poriferen unabhängig von ihrer phylogenetischen Position auftreten, ist die bakteriogene Herkunft – entweder von Actinobakterien oder von Proteobakterien – wahrscheinlich. Anzumerken ist, dass die Actinobacteria mit wenigen Ausnahmen aerobe Organismen umfassen, während viele Proteobakterien lediglich im anaeroben Milieu metabolisch aktiv sind. Zu den anaeroben mcb-Produzenten zählen beispielsweise *Desulfobacter* sp., *Pseudomonas nautica* oder *Vibrio cholerae*. Ferner ist interessant, dass in Bakterienisolaten an C-10 methylierte FA hervortreten, während in allen Poriferen mit hohem Gehalten an mcb-SCFA die 11-Methyloctadecansäure Hauptkomponente der FA-Fraktion ist. Das umfangreiche Probenmaterial, das für diese Arbeit zur Verfügung stand, sowie die gezielten lipidchemischen Untersuchungen in Kombination mit mikrobiologischen Experimenten ergaben deutliche Hinweise zur Phylogenie und Ökologie der mcb-Produzenten in *Bacteriosponges*. Festzuhalten ist:

- Die mcb-C<sub>18:0</sub> treten als Hauptkomponenten der FA-Fraktion in einer Reihe von Poriferen auf, die hinsichtlich ihres Habitus, ihrer lipidchemischen Daten und den mikrobiologischen Befunden als *Bacteriosponges* einzuordnen sind.
- Der Gehalt der mcb-SCFA nimmt mit zunehmender Distanz zur Außenschicht von *G. barretti* bis zu einer typischen Konzentration zu. Die Abwesenheit freien Sauerstoffs in mehr oder minder zentralen Gewebekompartimenten, wie sie von Hoffmann (2003) für diese Spezies nachgewiesen wurde, lässt einen fakultativ bzw. obligat anaeroben Stoffwechsel für die mcb-Produzenten vermuten.
- Mittkettig methylverzweigte FA sind im Vergleich zu weiteren SCFA in *G. barretti* an <sup>13</sup>C angereichert, was auf die Nutzung spezifischer C-Quellen oder typischer Biosynthesewege der Produzenten hinweist.

5.5.4 Verteilung der mcb-SCFA in Phospholipiden aus *G. macandrewii*Einführung

Phosphoglycerolipide (PL) und quantitativ untergeordnet Glycolipide sind die Grundbestandteile der Zytoplasmamembranen aller Organismen (s. Kapitel 2). Neben ihren vergleichsweise unpolaren Teilstrukturen, den Acyl-, Alkyl- und Alkenylketten, die aufgrund ihrer strukturellen Spezifität für Organismen allgemein eine herausragende Bedeutung als Lipidbiomarker haben, sind auch intakte PL von hohem Interesse. Zum überwiegenden Teil umfassen PL Glycerinderivate mit zwei aliphatischen Resten und einem phosphorylierten Alkohol. Die grundsätzlichen chemischen Unterschiede der PL-Klassen sind durch die Natur verschiedener Phosphoryl-Alkohole gegeben und führen zu ihrer entsprechenden Nomenklatur (Abb. 5.33).

Grundstruktur	X	Phospholipidklasse
		Phosphatidylglycerin (PG)
		Phosphatidylethanolamin (PE)
		Phosphatidylserin (PS)
		Phosphatidylinositol (PI)
		Phosphatidylcholin (PC)

**Abbildung 5.33** Strukturen häufig auftretender Phosphoglyceride (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> = Acyl-, Alkyl- oder Alkenylreste).

In den Lipidextrakten von Poriferen, die PL der Schwamm- und SAM-Zellen enthalten, wurden in mehreren Studien die Diacylglycerophosphat-Derivate Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Diphosphatidylglycerol (DPG, Cardiolipin) festgestellt (WALKUP *et al.*, 1981; AYANOGLU *et al.*, 1982; DASGUPTA *et al.*, 1984; LAWSON *et al.*, 1988; BARNATHAN *et al.*, 1992; GARSON *et al.*, 1994). Es ist bekannt, dass bestimmte PL-Klassen von verschiedenen Organismengruppen bevorzugt synthetisiert werden (LECHEVALIER und LECHEVALIER, 1988). Für hydrolysierte Acyl(PLFA)- und Alkylreste, deren Quellorganismen unbekannt sind, kann aus diesem Grund das Wissen um die relative Verteilung der PL-Kopfgruppe hinweisend auf ihre Produzenten sein.

Im Vordergrund der hier durchgeführten Analysen steht die Aufklärung der PL-Klassen, in denen die in den Kapiteln 4.2.5 und 5.1.5 beschriebenen kurzkettigen mcb-FA (mcb-SCFA) potenziell bakterieller Herkunft auftreten. Für diese Untersuchungen wurde der bakterienreiche Schwamm *Geodia macandrewii*, der ein den anderen in dieser Arbeit untersuchten Exemplaren der Gattung

*Geodia* ähnliches FA-Profil zeigt, ausgewählt. Während Studien mit ähnlichen Fragestellungen insbesondere an Schwämmen temperierter Habitate durchgeführt wurden, sind aus Kaltwasserschwämmen die PL-Klassen individueller FA bis jetzt unbekannt.

### Bakterien

Die Komposition der PL von Bakterien ist gut untersucht und oftmals sind PE, PG und DPG die Hauptlipide (GOLDFINE, 1984; LECHEVALIER und LECHEVALIER, 1988; O'LEARY und WILKINSON, 1988; WILKINSON, 1988). PC, PS und PI sowie diverse weitere Klassen finden sich in Bakterien allgemein in geringeren Konzentrationen, wenngleich sie in vereinzelt Gattungen in hohen Gehalten auftreten können. So wurde PI beispielsweise in hohen Konzentrationen in vielen Actinomycetes-Gattungen gemessen (BRENNAN, 1988; CHUN *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000; YAGÜE *et al.*, 2003). Es hat sich gezeigt, dass mit wenigen Ausnahmen innerhalb der Domäne charakteristische Verteilungsmuster der PL-Klassen auftreten. Dennoch wurde für einige Bakterienisolate auch festgestellt, dass die Kulturbedingungen einen deutlichen Einfluss auf das PL-Profil ausüben können (LANGWORTHY, 1982; RUSSELL und FUKUNAGA, 1990; HENDERSON *et al.*, 1993).

Für Gram-negative Bakterien, und speziell für Vertreter der Proteobacteria, wurde vielfach die Dominanz von PE und/oder PG berichtet, während DPG meist in geringeren Anteilen synthetisiert wird (SPRÖER *et al.*, 1998; DE ROSA *et al.*, 2000; RÜTTERS *et al.*, 2001; IVANOVA *et al.*, 2002). IVANOVA *et al.* (2000) und FANG *et al.* (2000) zeigten für zahlreiche Angehörige der  $\gamma$ -Proteobacteria, dass ihre PL-Profile gattungsspezifischen Charakter haben. Für Gram-positive Bakterien sind hohe Anteile an PG und DPG gefolgt von PE charakteristisch (KANEDA, 1972; UCHIDA, 1974a; LANGWORTHY, 1982; O'LEARY und WILKINSON, 1988).

### Schwämme

Die für Eukaryoten typischen Amino-Phospholipide PE und PS treten üblicherweise auch in Schwammzellen quantitativ hervor, während das in Animalia verbreitete PC oftmals in relativ geringeren Anteilen auftritt (z.B. LAWSON *et al.*, 1988; DEMBITSKY *et al.*, 1989; LAM *et al.*, 1989; DJERASSI und LAM, 1991; BARNATHAN *et al.*, 1994). Von mehreren Poriferen sind aber Ausnahmen von diesen generellen Verteilungsmustern bekannt.

Detaillierte Kenntnis über die PL-Komposition der Zellen einzelner Schwammarten haben Arbeiten an Zellanreicherungsfraktionen aus Schwämmen erbracht (LAWSON *et al.*, 1988; ZIMMERMAN *et al.*, 1990; GARSON *et al.*, 1994). Es hat sich gezeigt, dass in den Schwamm-Phospholipidklassen charakteristische FA-Profile vorliegen. So wurde in vielen Studien der überwiegende Teil der ‚demospongiac acids‘ in PE und/oder PC und mit eher geringeren Anteilen in PS oder PI beobachtet, während kurzkettige, vermutlich bakterienstämmige FA vornehmlich in PC gebunden sind (JEFFERTS *et al.*, 1974; AYANOGLU *et al.*, 1982; DJERASSI und LAM, 1991; LAM *et al.*, 1991). Abweichungen von diesen Mustern sind bekannt. Ferner können im Vergleich der PL-Klassen verschiedener Individuen die FA-Verteilungsmuster ebenfalls sehr unterschiedlich sein (LITCHFIELD *et al.*, 1980; WALKUP *et al.*, 1981; DASGUPTA *et al.*, 1984; DUQUE *et al.*, 1993).

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

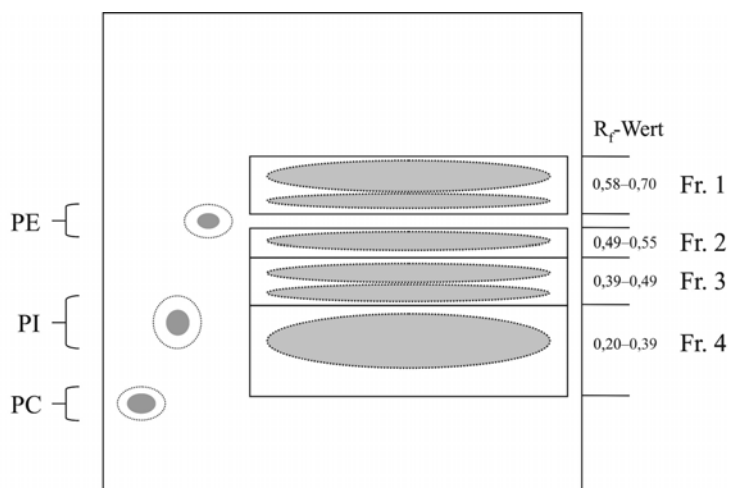
In einem Gemisch verschiedener PL-Klassen, wie es in bakterienreichen Schwämmen gegeben ist, können PG und DPG auf Bakterien zurückgeführt werden, während PC und PS charakteristisch für den Beitrag durch Schwammzellen sind. PE tritt in Bakterien- und Schwammzellen auf und ist demgemäß nur von eingeschränkter taxonomischer Bedeutung.

### Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die FA-Verteilung in individuellen PL-Klassen des bakterienreichen Demospongiae *Geodia macandrewii* untersucht. Wie in den organischen Extrakten nach Transveresterung beobachtet, verfügt *G. macandrewii* über hohe Gehalte an Steroidalkoholen (BLUMENBERG, 2003), die sich als freie Komponenten auch in den sog. Neutral- und Glycolipidfraktionen wiederfinden. SCFA und LCFA kamen dagegen vornehmlich estergebunden in der PL-Fraktion vor. Es wurde festgestellt, dass die FA-Verteilungsmuster im Gesamthydrolysat und in der PL-Gesamtfraktion sehr ähnlich sind.

Experimente mit verschiedenen Laufmitteln und anschließender Visualisierung mit UV-Licht, I<sub>2</sub>-Dampf oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung zeigten, dass die Dünnschichtchromatographie (DC) von PL aus Schwammextrakten zu zahlreichen Banden führte, deren Elutionsverhalten sich in vielen Fällen von dem käuflicher Standardsubstanzen unterscheidet.

Die Analyse des Auftretens mittkettig methylverzweigter SCFA am Beispiel der mcb-C<sub>18:0</sub>-Isomere in individuellen PL-Klassen aus *G. macandrewii* sollte weitere Hinweise auf ihre Produzenten liefern. In Abb. 5.34 ist das Laufverhalten der Standardsubstanzen, das generelle DC-Fraktionierungsschema der PL sowie die Differenzierung der Banden für *G. macandrewii* schematisch dargestellt.



**Abbildung 5.34** Schema der DC-Trennung des Phospholipidextrakts von *G. macandrewii* sowie der käuflichen Standards (R<sub>f</sub>-Bereiche: PC = 0,15–0,22, PI = 0,30–0,41 und PE = 0,53–0,60). Fr. 1 bis 4 kennzeichnen die isolierten Banden.

Wie aus Abb. 5.34 zu erkennen ist, wurden für die PL aus *G. macandrewii* nach der Visualisierung mit UV-Licht (254 und 366 nm) und universellen Nachweisreagenzien sechs Banden im R<sub>f</sub>-Bereich von 0,2 bis 0,7 identifiziert, von denen mehrere gegenüber den eingesetzten Standard-

substanzen deutlich abweichende Elutionsverhalten aufwiesen. Der Einsatz spezifischer Sprühreagenzien erbrachte lediglich für die Standardsubstanzen und nicht für die Schwammfraktionen eindeutige Ergebnisse, was möglicherweise auf eine vergleichsweise geringe Konzentration der PL aus dem Schwamm zurückgeführt werden kann. Aus diesem Grund wurden die vier in Abb. 5.34 gezeigten  $R_f$ -Bereiche für Banden mit ausreichender Trennung definiert und isoliert. Im Folgenden werden die PL-Fraktionen daher gemäß ihrer Elutionsreihenfolge mit Ziffern bezeichnet.

In Tabelle 5.11 sind die prozentualen Verteilungen ausgewählter FA und der Isomere mittkettig methylverzweigter  $C_{18}$ -FA in den jeweiligen PL-Fraktionen dargestellt.

**Tabelle 5.11** Relative Verteilung ausgewählter FA in Gew.-% in den Phospholipidfraktionen aus *G. macandrewii* (x = 21 oder 23).

Fraktion	<i>i</i> - $C_{15:0}$	<i>ai</i> - $C_{15:0}$	<i>n</i> - $C_{16:0}$	<i>n</i> - $C_{18:0}$	mcb- $C_{18:1}$	mcb- $C_{18:0}$	$C_{28:3}\Delta^{5,9,X}$
1	9,6	5,1	22,8	16,3	14,3	14,9	28,2
2	12,5	13,4	23,0	13,7	<b>55,9</b>	12,4	1,0
3	18,9	17,3	16,6	10,6	n.d.	5,7	0,9
4	59,0	64,3	37,5	59,3	29,8	<b>67,0</b>	69,9

Wie die Ergebnisse zeigen, sind mcb-SCFA in *G. macandrewii* in allen Fraktionen vorhanden. Die Isomere der mcb- $C_{18:0}$  sind mit höchsten prozentualen Anteilen in der Fraktion 4 vertreten und kommen auch in den Fraktionen 1 und 2 mit deutlichen Gehalten vor. Während die Bakterien-FA *i*- und *ai*- $C_{15:0}$  ebenfalls in Fraktion 4 mit höchsten Anteilen auftreten, findet sich der überwiegende Teil der mcb- $C_{18:1}$  in der Fraktion 2. *n*- $C_{16:0}$  und *n*- $C_{18:0}$  werden von Bakterien und Eukaryoten synthetisiert und wurden mit höchsten prozentualen Anteilen ebenso wie die typischen ‚demospongiac acids‘  $C_{28:3}\Delta^{5,9,X}$  in der Fraktion 4 beobachtet.

### Diskussion

Die Trennung der PL-Klassen in dem Demospongiae *G. macandrewii* mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ergab eine Reihe von Banden. Hierbei wurden für die meisten Banden abweichende Laufverhalten von den als Standardverbindungen eingesetzten käuflichen PL beobachtet. In Bezug zu den PL-Standards ähnliche  $R_f$ -Bereiche können dennoch für einige aus den Schwämmen isolierte Fraktionen bestimmte Strukturen der Phosphorylgruppen angenommen werden.

Spezifische FA wurden in allen isolierten Fraktionen in verschiedenen Gehalten festgestellt. Dabei wurden höchste Gehalte (67 Gew.-%) der mcb- $C_{18:0}$  in der Fraktion 4 beobachtet. In dieser Fraktion wurden weiterhin vergleichsweise höchste Gehalte der von Eukaryoten und Bakterien synthetisierten *n*- $C_{16:0}$  und *n*- $C_{18:0}$ , der für Bakterien charakteristischen endständig verzweigten  $C_{15}$ -FA sowie der ‚demospongiac acids‘ beobachtet. Es ist aus diesem Grund anzunehmen, dass die in Fraktion 4 isolierte Bande PL von Bakterien- und Schwammzellen umfasst. Aus Abb. 5.34 ist zu erkennen, dass die Bande höhere  $R_f$ -Werte als das Standard-PC aufwies und sich teilweise mit dem Standard-PI überschneidet. Aufgrund dieser Eigenschaften kann vermutet werden, dass zumindest Teile der Bande das beispielsweise in vielen Actinobakterien stark vertretene PI beinhalten. In diesem

Zusammenhang ist eine Studie von WALKUP *et al.* (1981) an dem ceractinomorphen Demospongiae *Aplysina fistularis* interessant, in dem die PI-Fraktion deutlich (34,0 Gew.-%) von einer 11-Me-C<sub>18:0</sub> dominiert wird. Die Autoren vermuten für diese Komponente aufgrund ihrer Struktureigenschaften einen bakteriellen Produzenten.

Mit jeweils > 10 Gew.-% wurden signifikante Konzentrationen der mcb-C<sub>18:0</sub>-Isomere auch in den gering retendierten Fraktionen 1 und 2 aufgefunden, in denen jeweils gut getrennte Banden zusammengefasst wurden (Abb. 5.34). Vorversuche mit käuflichen Standard-PL zeigten, dass unter den angewandten DC-Bedingungen PG und DPG stärker eluieren als PE. Unter Berücksichtigung dieser Elutionsreihenfolgen kann vermutet werden, dass die Fraktionen 1 und 2 neben PE auch die von vielen Bakterien in hohen Konzentrationen synthetisierten PG und/oder DPG beinhalten. Eine Bindung der mcb-C<sub>18:0</sub>-Isomere in PE oder DPG bzw. PG von Bakterien ist daher sehr wahrscheinlich. Ebenfalls in der PG-Fraktion wurden von DASGUPTA *et al.* (1984) die höchsten Anteile der genannten, vermutlich bakteriellen 11-Me-C<sub>18:0</sub> im haploscleriden *Strongylophora durissima* bestimmt.

Unter biosynthetischen Gesichtspunkten bemerkenswert ist das Auftreten der mcb-C<sub>18:1</sub>-Isomere in *G. macandrewii*. Wie die Ergebnisse in Tabelle 5.11 zeigen, treten diese Komponenten im Gegensatz zu ihren gesättigten Homologen mit höchsten Gehalten in Fraktion 2 und mit geringeren Anteilen in Fraktion 4 auf. Eine detaillierte Strukturaufklärung der PL-Klassen von *G. macandrewii* zur eindeutigen Zuordnung individueller Phosphorylreste muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Dennoch wurden in dieser Arbeit deutliche Hinweise auf die Verteilung von FA in PL-Klassen eines Kaltwasserschwammes gewonnen.

### 5.6 Zusammenfassende Diskussion des bakteriellen Lipidinventars

In den untersuchten Tief- und Kaltwasserporiferen der Klassen Hexactinellida und Demospongiae wurden Fettsäuren (FA) und Hopanoide, die den Zytoplasmamembranen des jeweiligen Schwammes und vergesellschafteter Bakterien entstammen, in sehr unterschiedlichen Verteilungen beobachtet. Viele der in den Schwämmen beobachteten FA sind auch aus den SAB-Kultivaten mit weiter Verbreitung in unterschiedlichen Taxa bekannt. Die erfassten Membranlipidbestandteile eignen sich daher zur generellen qualitativen und semiquantitativen Charakterisierung des Bakterieninventars in Schwämmen und in einigen Fällen zur Zuordnung zu spezifischen Bakterientaxa. Mögliche Marker für Cyanobacteria, Protozoa oder Fungi wurden nur gelegentlich und in geringen Konzentrationen festgestellt.

Die bimodale Verteilung der FA in Poriferen hoher Bakteriendichte sowie die Kenntnis der FA im Zellmaterial schwammstämmiger Bakterienkultivate (s. Kapitel 4) und in Bakterien anderer Habitate erlauben ihre generelle Zuordnung zu prokaryotischen (SCFA,  $\leq C_{19}$ ) und eukaryotischen (LCFA,  $> C_{19}$ ) Quellorganismen. Kurzkettige lineare FA, die sowohl von Schwamm- als auch von Bakterienzellen synthetisiert werden, konnten durch einen Vergleich von bakterienarmen und bakterienreichen Schwämmen differenziert werden. Diese Zuordnung zugrunde legend wurde das Bakterienlipidinventar statistisch erfasst, so dass eine relative Einordnung der Schwämme in Bezug auf ihren Bakteriengehalt durchgeführt werden konnte.



Es hat sich gezeigt, dass auf Grundlage der FA-Verteilung vereinzelte Hexactinellida, wie z.B. *H-unknown* sp. 3 (Euplectellidae) und *Hyalonema* sp. 1 (Hyalonematidae), und viele Demospongien verschiedener Familien bakterienreiche Schwämme sind. In diesen wurden oftmals sehr ähnliche SCFA-Profile vorgefunden. In anderen Spezies wurden dagegen geringe Gehalte an SCFA festgestellt, was sie als bakterienarme Exemplare ausweist. Hierzu zählt im Allgemeinen die Gruppe der Hexactinellida, deren Vertreter sich mit den oben genannten Ausnahmen durch ähnliche FA-Profile auszeichnen. Häufig sind Poriferen mit dichter Population assoziierter Bakterien durch eine massige Struktur mit großem Mesohylanteil und festem Exopinakoderm gekennzeichnet. Zu diesen zählen beispielsweise Spezies der Astrophorida, der Haplosclerida sowie der Halichondrida. Die hohe Anzahl strukturell unterschiedlicher SCFA ( $n \approx 70$  in den Hexactinellida und  $n \approx 90$  in den Demospongiae) in bakterienreichen Schwämmen weist auf die Beiträge phylogenetisch diverser Bakteriengruppen hin.

In vielen Fällen wurden neben linearen gesättigten und ungesättigten Verbindungen methylverzweigte oder substituierte FA festgestellt. Substanzklassen bzw. diskrete Verbindungen, die sowohl von Bakterien als auch von Eukaryoten bekannt sind, wurden anhand ihres relativen Gehalts in Schwämmen verschiedener Bakteriendichte der wahrscheinlichen Produzentengruppe zugeordnet.

Bei einem Vergleich von Poriferen mit verschiedenen Gehalten potenziell bakterieller FA ist auffallend, dass relativ hohe Gehalte gesättigter *n*-SCFA in bakterienarmen Individuen auftreten. Demzufolge ist davon auszugehen, dass diese Komponenten in bakterienarmen Schwämmen in hohem Maße schwammeigene Syntheseprodukte sind. In bakterienreichen Poriferen ist eine auf eukaryotische Zellen beschränkte Produktion der *n*-SCFA dagegen unwahrscheinlich. Wie die Ergebnisse der FA-Analyse von Kultivaten der SAB zeigen, treten gesättigte *n*-SCFA z.B. in  $\gamma$ -Proteobakterien in deutlichen Gehalten (bis 45 Gew.-%) gemeinsam mit einfach ungesättigten SCFA auf (s. Kapitel 4). Mit dem Verhältnis  $n\text{-C}_{16:0}/n\text{-C}_{18:0}$  wurde ein aussagekräftiger Parameter zur vorläufigen Charakterisierung der Bakteriendichte in Schwämmen gefunden. Wie die Werte zeigen, liegen in bakterienreichen Schwämmen vergleichsweise erhöhte Gehalte der  $n\text{-C}_{16:0}$  vor, was auf den Beitrag durch SAB zurückgeführt werden kann.

Vergleichsweise hohe mono-*n*-SCFA/LCFA-Verhältnisse wurden in bakterienreichen Schwämmen beobachtet. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass der Beitrag einfach ungesättigter SCFA und auch gesättigter *n*-SCFA in bakterienreichen Poriferen durch SAB relativ hinter dem weiterer Bakterien-SCFA zurücktritt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Zelltrennungsexperimenten an verschiedenen tropischen Schwämmen, bei denen  $n\text{-C}_{16}$  und  $n\text{-C}_{18}$  jeweils in den Anreicherungsfraktionen der Schwamm- und Mikroorganismenzellen gefunden wurden (ZIMMERMAN *et al.*, 1989; GARSON *et al.*, 1994). Aufgrund der weiten Verbreitung gesättigter und einfach ungesättigter SCFA unter den Bakterien und den Eukaryoten sind Aussagen zur Phylogenie der Produzenten nicht möglich. Vertreter der Proteobakterien, die sich in vielen Arbeiten als bedeutende SAB-Gruppe herausgestellt haben (s. Kapitel 2.5), tragen aber sehr wahrscheinlich zu diesem Inventar bei.

Terminal und mittkettig methylverzweigte SCFA wurden in vergleichsweise hohen Gehalten in fast allen Poriferen mit starkem Anteil an kurzkettigen FA aufgefunden und stammen wahrscheinlich von Bakterien. Da beide Substanzklassen Marker für phylogenetisch distanzierte – verschiedene

## 5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae

---

Gram-positive und Gram-negative – Bakterien sind, weist ihr gemeinsames Hervortreten in *Bakterienschwämmen* ferner darauf hin, dass in diesen eine hohe bakterielle Diversität vorliegt. Auffallend ist das gemeinsame Hervortreten der *i*- und *ai*-C<sub>15:0</sub>, mit bis zu 10 % der Fraktion in bakterienreichen Schwämmen, die möglicherweise die Anwesenheit Sulfat reduzierender  $\delta$ -Proteobakterien anzeigen (TAYLOR und PARKES, 1983; EDLUND *et al.*, 1985). Weitere terminal verzweigte SCFA können jedoch aufgrund ihrer Synthese durch eine Reihe verschiedener Bakterientaxa keinen Spezies zugeordnet werden.

Interessant ist das Vorkommen komplexer Isomergemische mittkettig methylverzweigter FA (mcb-FA), deren Produzenten bislang unbekannt sind und die in dieser Arbeit in *Bakterienschwämmen* als dominanter Lipidtyp (bis > 50 Gew.-% der SCFA-Fraktion) erfasst wurden. Neben ihren strukturellen Eigenschaften und der C-Anzahl der Hauptkomponenten (C<sub>19</sub>) legt das bevorzugte Auftreten in bakterienreichen Schwämmen die bakterielle Herkunft kurzkettiger Angehöriger dieser Lipidklasse nahe. Die Analyse der Phospholipidfraktion aus *Geodia macandrewii* zeigte, dass 67 Gew.-% der mcb-C<sub>18:0</sub>-Isomere in einer dünn-schichtchromatographisch getrennten Bande vorliegen. Im Gegensatz dazu wurden mit etwa 56 Gew.-% höchste Anteile der einfach ungesättigten Homologe (mcb-C<sub>18:1</sub>) in einer anderen isolierten Phospholipidfraktion festgestellt.

Durch detaillierte lipidchemische Untersuchungen des Gewebes des bakterienreichen Demospongiae *Geodia barretti* wurden Hinweise auf die Verteilung der Quellorganismen mcb-SCFA gewonnen. Kombiniert mit den Befunden parallel durchgeführter mikrobiologischer Analysen (HOFFMANN, 2003) konnten Aussagen zur O<sub>2</sub>-Toleranz der gesuchten Bakterien getroffen werden. Vor dem Hintergrund bekannter Vorkommen strukturverwandter Membran-FA in Bakterienisolaten sind (fakultativ) anaerobe Actinomyceten und Vertreter verschiedener Proteobakterienklassen wahrscheinliche Produzenten von mcb-SCFA (BOON *et al.*, 1977; BRENNAN, 1988; ARIES *et al.*, 2001). Mitglieder beider Bakteriengruppen sind auch für andere Schwämme dokumentiert (SCHUMANN-KINDEL *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 2001b; GRABOWSKI, 2002; HENTSCHEL *et al.*, 2002). Unterstützt durch die Ergebnisse der Analyse stabiler C-Isotope konnte gezeigt werden, dass, in Analogie zu den Befunden früherer Studien an anderen Bakterien-FA in Schwämmen, auch mcb-SCFA von Schwammzellen aufgenommen und elongiert werden (s. Kapitel 5.5.2.2).

Ungeklärt sind zunächst die Ursachen, die zur bevorzugten Synthese methylverzweigter FA durch Bakterien in den untersuchten Schwämmen führen. Die Synthese verschiedener Konzentrationen individueller verzweigter Membran-FA ist als Folge thermischer Adaptionen von einigen Bakterien bekannt (RUSSELL und FUKUNAGA, 1990; SUUTARI und LAAKSO, 1992). Jedoch wurden hohe Gehalte terminal und mittkettig verzweigter FA in den untersuchten Kaltwasserdemospongien und, in einer gesonderten Studie, auch in dem mediterranen *Agelas oroides* festgestellt (THIEL *et al.*, 1999a). KANEDA (1977) vermutet basierend auf der vergleichsweise primitiven Struktur und O<sub>2</sub>-Unabhängigkeit der verantwortlichen Synthetase, dass sich verzweigte FA vornehmlich in entwicklungs-geschichtlich niedrig stehenden Organismen finden. Möglicherweise sind somit hohe Gehalte terminal und mittkettig verzweigter FA in *Bakterienschwämmen* Ausdruck seit präkambrischen Zeiten bestehender Assoziationen mit primitiven Bakterien.

Diese Annahme wird durch die Beobachtung oftmals komplexer Gemische mittkettig methylverzweigter C<sub>12</sub>- bis C<sub>36</sub>-Alkane in vielen Sedimenten und Rohölen präkambrischen bis rezenten Alters, für die mcb-FA als mögliche Vorläuferkomponenten in Betracht gezogen werden, unterstützt

(FOWLER und DOUGLAS, 1987; SUMMONS, 1987; SUMMONS *et al.*, 1988; HÖLD *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2003). In Bezug auf das bevorzugte Auftreten mittkettig methylverzweigter Alkane in proterozoischen und frühpaläozoischen Ablagerungen wird beispielsweise spekuliert, dass die mittkettige Methylierung von *n*-alkyl-Lipiden eine ursprüngliche Strategie der Membranadaptation unter O<sub>2</sub>-freien Bedingungen ist, die evolutionär durch O<sub>2</sub>-abhängige Desaturase-Biosynthesewege erweitert wurde (SUMMONS, 1987). In einer späteren Arbeit vermuteten die Autoren, dass mittkettig methylverzweigte Alkane in spätproterozoischen Sedimenten speziellen Bakterien entstammen, die rezent „deutlich weniger stark vertreten sind oder in Habitaten leben, aus denen kein quantitativ signifikanter Beitrag sedimentärer Lipide hervorgeht“ (SUMMONS *et al.*, 1988). Für Schwämme nehmen THIEL *et al.* (1999a) an, dass die bakteriellen Quellorganismen der mcb-SCFA in der geologischen Vergangenheit weit verbreitet waren und bis heute unter den typischen Milieubedingungen des Schwammgewebes fortbestehen konnten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Entdeckung von Gemischen gleicher Isomere der mcb-FA in subrezentem Kompartimenten von Biofilmen im hoch alkalinen Walker Lake in Nevada (V. Thiel, pers. Mitt.).

In der vorliegenden Arbeit wurden im Probenmaterial einige nicht aus Schwämmen bekannte Verbindungen festgestellt. Von besonderem Interesse ist hierbei eine Serie langkettiger (> C<sub>29</sub>) Dicarbonsäuren, da sie von hoher Spezifität für Angehörige der Clostridia sind und hier ausnahmslos in *Bacteriosponges* gefunden wurden. Im Hinblick auf mögliche gemeinsame Quellorganismen sind in diesem Zusammenhang ebenso Monoalkylglyceroletherlipide mit C<sub>14</sub>- bis C<sub>19</sub>-Alkyleinheiten bemerkenswert, deren Auftreten auch auf bakterienreiche Schwämme begrenzt ist und die ebenfalls für Clostridien, aber auch für Sulfat reduzierende Proteobakterien dokumentiert sind (LANGWORTHY und POND, 1986b; RÜTTERS *et al.*, 2001). In einem Kern eines CH<sub>4</sub>-seeps des pazifischen Santa-Barbara-Beckens stellten HINRICHS *et al.* (2000) auffällige Übereinstimmungen in der Verteilung der Kettenlängen von FA-Resten und Monoalkylglycerolethern fest. Die Autoren vermuten daher die gleiche biogene Quelle, wie z.B. Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien, für beide Substanzklassen. Die Frage, ob in den Poriferen mcb-FA, Dicarbonsäuren sowie Monoalkylglyceroletherlipide gleichen SAB entstammen, muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Erstaunlich ist das Fehlen kurzkettiger OH-substituierter FA in fast allen untersuchten Schwamm-extrakten, das auch Studien zahlreicher anderer Bearbeiter dokumentieren, da diese Komponenten in vielen Bakterien obligate Bestandteile der Zytoplasmamembran sind. Kurzkettige Hydroxy-FA wurden dagegen in vielen der aus den Poriferen nachgewiesenen bzw. isolierten Bakterien (Kapitel 4.2.6) und ihnen phylogenetisch nahe stehenden Kultivaten beobachtet.

Triterpenoide vom Hopanoidtyp wurden ausnahmslos in bakterienreichen Schwämmen vorgefunden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind *bishomo*-Hopansäure sowie Diplopten, Neohop-13(18)-en und Hop-17(21)-en direkte oder frühdiagnostisch modifizierte Syntheseprodukte von SAB-Lipiden. Die Anwesenheit nicht direkt identifizierter Bakteriohopanpolyole wurde durch *bishomo*-Hopan-32-ol als chemisches Degradationsprodukt bestätigt. Aussagen zu der phylogenetischen Position Hopanoide produzierender SAB können aber nicht getroffen werden, da Hopanoide von zahlreichen Bakterientaxa bekannt sind. Quantitativ sind Hopanoide untergeordnet am bakteriellen Lipidinventar von *Bakterienschwämmen* beteiligt.

## **5 Bakterienlipide in Hexactinellida und Demospongiae**

---

Abschließend ist festzuhalten, dass viele Signaturlipide, die bis jetzt noch nicht von Schwämmen berichtet wurden, oftmals für thermophile und/oder anaerobe Bakterien dokumentiert sind. Die Annahme zugrunde legend, dass lediglich diese Taxa zur Synthese der betreffenden FA befähigt sind, müssen unbekannte psychrophile Verwandte dieser Bakterien als Endobionten der Poriferen vermutet werden.

## 6 Archaeenlipide in Hexactinellida und Demospongiae

### 6.1 Einleitung

Das ubiquitäre Auftreten von Archaeen in marinen Habitaten wurde erst in jüngster Zeit durch biochemische und molekularbiologische Arbeiten nachgewiesen (DELONG, 1992; FUHRMAN *et al.*, 1992). Archaeen als Bestandteil der Schwamm-Mikroorganismen-Gemeinschaft waren bis vor kurzem unbekannt und seit der Erstarbeit von PRESTON *et al.* (1996) haben nur drei weitere mikrobiologische Studien das Vorkommen dieser Prokaryoten in Schwammgeweben belegen können (FUERST *et al.*, 1999; WEBSTER *et al.*, 2001a; MARGOT *et al.*, 2002). Einer Kultivierung unter Laborbedingungen haben sich schwammassoziierte Archaeen bis jetzt entzogen. Der eindeutige Beleg von Archaeen in Poriferen mit Hilfe organisch-chemischer Verfahren gelang erstmals im Rahmen dieser Arbeit.

Die Domäne der Archaea ist aufgrund vieler charakteristischer Merkmale allgemein von großem wissenschaftlichem Interesse. Ein Großteil der Archaeen verfügt über ein Inventar vergleichsweise stabiler Zellbestandteile, das sie zur Besiedlung von Standorten extremer Bedingungen befähigt. Für eine mögliche biotechnologische Nutzung werden daher zur Zeit beispielsweise die Syntheseleistungen für ungewöhnliche Enzymsysteme oder thermostabile Lipide eingehend untersucht (VANDAMME, 1994; VAN DE VOSSBERG *et al.*, 1998; HOUGH und DANSON, 1999; ILLANES, 1999; NIEHAUS *et al.*, 1999; CAVICCHIOLI *et al.*, 2002; SCHIRALDI *et al.*, 2002).

Lipidbestandteile isoprenoider Struktur sind charakteristische Markerverbindungen für Archaeen, die in vielen Arbeiten an rezemem und fossilem Material zum Nachweis dieser Domäne eingesetzt worden sind (MICHAELIS und ALBRECHT, 1979; CHAPPE *et al.*, 1982; HOEFS *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998; SCHOUTEN *et al.*, 1998; BIAN *et al.*, 2001; ORPHAN *et al.*, 2001; PANCOST *et al.*, 2001b; THIEL *et al.*, 2001; KUYPERS *et al.*, 2002). Labor- aber auch Feldstudien haben gezeigt, dass diskrete Isoprenoide sowie komplexe Verbindungen mit isoprenoiden Teilstrukturen zur chemotaxonomischen Charakterisierung der Produzenten sowie zur Berechnung ihrer Zellzahlen und Stoffumsätze geeignet sind (TORNABENE und LANGWORTHY, 1978; LANGWORTHY, 1982; LANGWORTHY und POND, 1986a; NICHOLS *et al.*, 1987; KOGA *et al.*, 1993b; OHTSUBO *et al.*, 1993; GAMBACORTA *et al.*, 1994; DELONG *et al.*, 1998; HINRICHS *et al.*, 1999; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002a).

Es sind zwei Typen der Etherlipide von Archaeen bekannt. Abb. 6.1 zeigt die Struktur des Dietherlipids Archaeol (2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerol bzw. 2,3-di-*O*-(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)-*sn*-glycerol), das universell von Archaeen synthetisiert wird und insbesondere in Euryarchaeota hervortritt (GAMBACORTA *et al.*, 1994; UPASANI *et al.*, 1994; KOGA *et al.*, 1998; GATTINGER *et al.*, 2002).

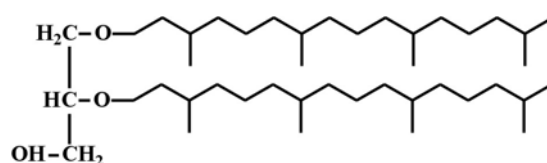


Abbildung 6.1 Struktur des Archaeols (2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerol).

In vielen Eury- und Crenarchaeota findet sich des Weiteren das Tetraetherlipid Caldarchaeol (2,3,2',3'-tetra-*O*-dibiphytanyl-di-*sn*-glycerol, Abb. 6.2) sowie seine Derivate mit Cycloalkyleinheiten in den Isoprenoidresten (LANGWORTHY, 1985; DE ROSA und GAMBACORTA, 1988; KOGA *et al.*, 1993a).

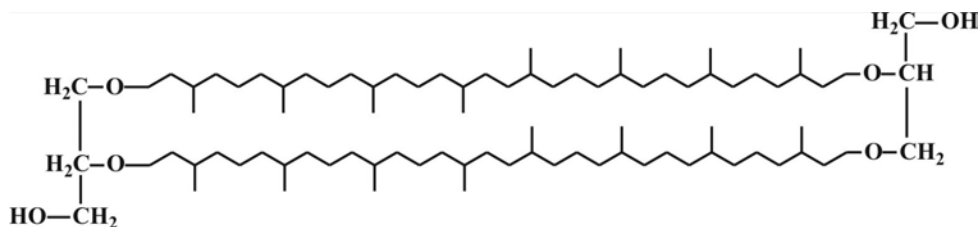


Abbildung 6.2 Struktur des Caldarchaeols (2,3,2',3'-tetra-*O*-dibiphytanyl-di-*sn*-glycerol).

Biphytane mit bis zu vier Pentylringen in einem Biphytanylrest (Strukturformeln s. Abb. 6.5) sind vor allem aus Kulturen (hyper)thermophiler Archaeen bekannt. Für Vertreter der Euryarchaeota sind bis jetzt Biphytane mit maximal zwei Alkylcyclen zweifelsfrei nachgewiesen, so dass Biphytane mit drei und vier Pentylresten als Marker für das Phylum der Crenarchaeota angesehen werden (DE ROSA *et al.*, 1983; GATTINGER *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002). In Laborstudien an den thermophilen Euryarchaeota *Thermoplasma acidophilum*, *Pyrococcus horikoshii* sowie den Crenarchaeota *Sulfolobus acidocaldarius* und *solfataricus* wurde gezeigt, dass die Anzahl der Alkylreste mit der Kultivierungstemperatur zunimmt (DE ROSA *et al.*, 1980; GLIOZZI *et al.*, 1983a; ITOH *et al.*, 2001). Demzufolge wird vermutet, dass der Grad der Cyclisierung entscheidend die Fluiditätseigenschaften der Zytoplasmamembran thermophiler Organismen beeinflusst.

Biphytane mit Ringstrukturen sind aber nicht auf thermophile Archaeen begrenzt, sondern treten auch in moderat bis gering temperierten Gebieten auf. CHAPPE *et al.* (1982) führten in einer frühen Studie an (sub)rezenten bis fossilen Depositionen verschiedener Standorte das Auftreten von Biphytanen mit bis zu zwei Pentylringen auf den Eintrag durch Euryarchaeota zurück. In CH<sub>4</sub>-assoziierten Mikroorganismenmatten, die sich aus Sulfat reduzierenden Proteobakterien und Euryarchaeota, die der Ordnung Methanosarcinales nahe stehen, zusammensetzen, wurden acyclische sowie mono- und bicyclische Biphytane festgestellt (MICHAELIS *et al.*, 2002).

Umfassende Biomarkerstudien planktonischen Materials erbrachten den Nachweis einer weiten Verbreitung von Biphytanen und intakten Tetraetherlipiden mit Alkylringen im marinen Bereich (HOEFS *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998; SCHOUTEN *et al.*, 2000; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002a; WAKEHAM *et al.*, 2003). Gestützt durch die Ergebnisse phylogenetischer Analysen an marinen Proben sowie der biochemischen Untersuchungen von Anreicherungskulturen der in dem Schwamm *Axinella mexicana* lebenden Varietäten des Crenarchaeons *Cenarcheum symbiosum*, wird die Bildung cyclisierter Biphytane in diesen Habitaten bevorzugt auf nonthermophile Crenarchaeota zurückgeführt (DE LONG, 1992; HERSHBERGER *et al.*, 1996; FUHRMAN und DAVIS, 1997; DE LONG *et al.*, 1998; KARNER *et al.*, 2001).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde die Struktur des für planktonische Crenarchaeota diagnostischen Tetraetherlipids Crenarchaeol mit NMR-Untersuchungen identifiziert (SCHOUTEN *et al.*, 2000; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002b). Wie Abb. 6.3 zeigt, verfügt Crenarchaeol über ein C<sub>40</sub>-Isoprenoid mit zwei Pentylringen und eines mit zwei Pentyl- und einem Hexylring.

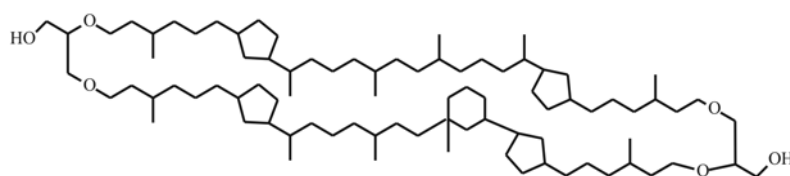


Abbildung 6.3 Struktur des Crenarchaeols.

Die Synthese des alternativen Cyclohexylrestes durch marine mesophile Crenarchaeota – im Gegensatz zu ihren thermophilen Verwandten – wird als adaptive Modifikation der Membraneigenschaften an Umgebungen geringer Temperaturen interpretiert (SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002b).

Die lipidchemischen Untersuchungen an zahlreichen Poriferen in dieser Arbeit zeigten das Auftreten freier und ethergebundener Isoprenoide, die als Biomarker für Archaeen bekannt sind bzw. deren Herkunft auf Archaeen zurückgeführt wird. Zur Untersuchung von Archaeenlipiden in Poriferen wurden die im Methodenteil (Anh. D) sowie in THIEL *et al.* (2002) und PAPE *et al.* (2004) beschriebenen Verfahren eingesetzt. Freie Isoprenoide wie PME oder Lycopan wurden in der KW-Fraktion gesamtorganischer Extrakte analysiert. Ethergebundene Isoprenoide, zu denen Phytan und verschiedene Biphytane zählen, wurden in der Fraktion hydrolysierter Neutrallipide hoher Polarität nach Behandlung mit HI und  $\text{LiAlH}_4$  festgestellt. Ein detaillierte Darstellung der Ergebnisse findet sich in THIEL *et al.* (2002) und PAPE *et al.* (2004) im Anhang dieser Arbeit. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse kurz dargestellt und diskutiert.

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 Freie Isoprenoidkohlenwasserstoffe – Pentamethyleicosan und Lycopan

In einer umfassenden Lipidbiomarker-Untersuchung zahlreicher Spezies aller rezenten Schwammklassen, den Hexactinellida, den Demospongiae und den Calcarea, wurden der irreguläre  $\text{C}_{25}$ -Isoprenoid-KW PME (2,6,10,15,10-Pentamethyleicosan) sowie mehrere ungesättigte Abkömmlinge ( $\Delta^0$ -2) aufgefunden (THIEL *et al.*, 2002). Ebenfalls in dieser Fraktion ist sehr häufig auch das irreguläre  $\text{C}_{40}$ -Isoprenoid Lycopan (2,6,10,14,19,23,27,31-Octamethyldotriacontan) zu finden. In Abb. 6.4 ist exemplarisch das Massenspektrum eines Pentamethyleicosens dargestellt.

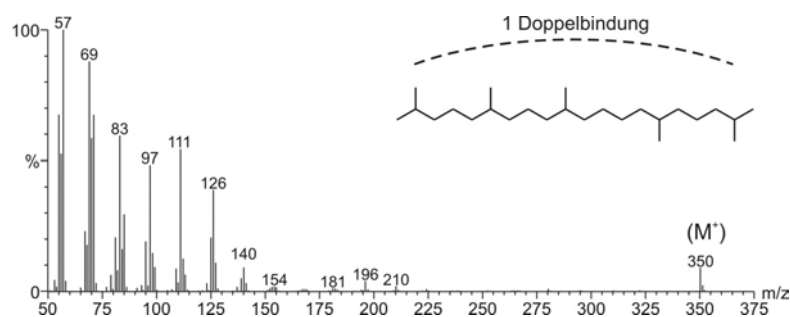


Abbildung 6.4 MS-Fragmentierungen ( $\text{EI}^+$ ) und abgeleitete Strukturen eines Pentamethyleicosens aus *Aulosaccus cf. mitsukuri*.

## 6 Archaeenlipide in Hexactinellida und Demospongiae

Sowohl PME-Derivate als auch Lycopan wurden in allen Hexactinelliden und zwei Demospongiae beobachtet. In Erweiterung des von THIEL *et al.* (2002) dargestellten Auftretens von PME und Lycopan in Schwämmen gibt Tabelle 6.1 zusätzlich ihr Vorkommen in den weiteren in dieser Arbeit untersuchten Demospongiae wieder. Das Lipidinventar der *Calcarea* wird hingegen in dieser Arbeit nicht bearbeitet.

**Tabelle 6.1** Vorkommen von PME ( $\Delta$ 1-3) und Lycopan in Demospongiae.

	Spezies	PME $\Delta$ (Anzahl der Doppelbindungen)	Lycopan
Tetractinom.	<i>Geodia macandrewii</i>		
	<i>Geodia barretti</i> *)		
	<i>Pachymatisma johnstonii</i>		
Ceractinomorpha	<i>Forcepia forcipis</i>		●
	<i>Mycale lingua</i>	○ (2)	●
	<i>Haliclona</i> sp. 1 *)		
	<i>Haliclona</i> sp. 2	●● (1, 2)	○
	<i>Petrosia crassa</i> *)	● (1, 2)	
	<i>Hemigellius pumiceus</i>		
	<i>Phakellia ventilabrum</i> *)		
	<i>Phakellia rugosa</i>		
	<i>Axinella infundibuliformis</i> *)	● (1, 2)	●
	<i>Dendrilla cirsioides</i>	● (1, 2, 3)	○

\*) = entnommen aus THIEL *et al.* (2002), Table 3; ●● = rel. hohe Konzentrationen, ● = moderate Konzentrationen, ○ = rel. geringe Konzentrationen, kein Eintrag = nicht nachgewiesen. In Fett gedruckte Anzahl der Doppelbindungen beschreibt das dominante Homolog.

Lediglich vereinzelt und dann in vergleichsweise deutlich geringeren Gehalten wurden diese Verbindungen in Demospongiae gefunden. Unter den Demospongiae wurden Isoprenoid-KW lediglich in ceractinomorphen, vornehmlichen bakterienarmen Schwämmen beobachtet. Gesättigtes PME fehlt grundsätzlich in Demospongiae. Im Gegensatz zu den Hexactinellida, bei denen die Fraktionen aller Spezies vom Lycopan dominiert werden, treten bei einigen Demospongiae, wie *Haliclona* sp. 2 oder *Dendrilla cirsioides*, ungesättigte PME-Derivate gegenüber dem C<sub>40</sub>-Isoprenoid hervor. Während in allen hexactinelliden Spezies beide Isoprenoide auftreten, wurde für einige Demospongiae das Fehlen einer individuellen Komponente beobachtet.

### 6.2.2 Ethergebundene Isoprenoidkohlenwasserstoffe – Phytan und Biphytane

Zum Nachweis ethergebundener Isoprenoide in den Schwämmen wurden ausgewählte Fraktionen polarer Neutrallipide mit HI und LiAlH<sub>4</sub> behandelt (s. Anh. Methoden). Die freigesetzten Isoprenoid-KW wurden vermessen.

Das C<sub>20</sub>-Isoprenoid Phytan (3,7,11,15-Tetramethylhexadecan) fand sich in der Fraktion polarer Neutrallipide nach Spaltung von Etherbindungen in geringen Konzentrationen ausnahmslos in solchen Schwammarten, die wie z.B. *A. cf. mitsukuri* und *P. ventilabrum* auch die für Archaeen charakteristischen Biphytane enthalten. Freies Phytan wurde in keiner Spezies beobachtet. In der Fraktion polarer Neutrallipide traten nach Reaktion mit HI und LiAlH<sub>4</sub> in mehreren der untersuchten



hexactinelliden Poriferen und Angehörigen der Demospongiae das C<sub>40</sub>-Isoprenoid Biphytan (3,7,11,15,18,22,26,30-Octamethyldotriacontan) und Derivate mit einem bis drei internen Alkylcyclen auf (PAPE *et al.*, 2004). Ihr Vorkommen in den untersuchten Schwämmen zeigt Tabelle 6.2.

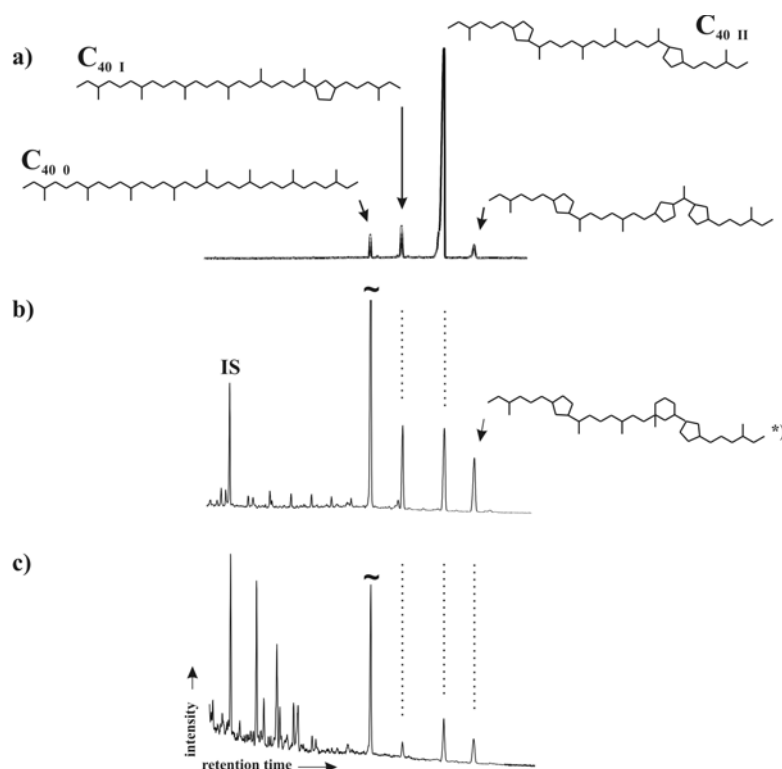
**Tabelle 6.2** Auftreten von Biphytanen in den untersuchten Hexactinellida und Demospongiae (PAPE *et al.*, 2004).

Unterklasse	Spezies	Biphytane
<u>Hexactinellida</u>		
<i>Hexasterophora</i>	<i>Aulosaccus cf. mitsukuri</i>	•
	<i>Ipheton panicea</i>	•
<i>Amphidiscophora</i>	<i>Hyalonema (?) sp. 1</i>	tr.
	<i>Hyalonema sp. 2</i>	
<u>Demospongiae</u>		
<i>Tetractinomorpha</i>	<i>Geodia barretti</i>	
	<i>Pachymatisma johnstonii</i>	
<i>Ceractinomorpha</i>	<i>Mycale lingua</i>	•
	<i>Phakellia ventilabrum</i>	•
	<i>Phakellia robusta</i>	•

kein Eintrag = nicht nachgewiesen, tr. = in Spuren.

Anhand ihrer massenspektrometrischen Charakteristika wurden neben dem acyclischen C<sub>40 0</sub> die mono- bis tricyclischen Strukturverwandten C<sub>40 I</sub>, C<sub>40 II</sub> und C<sub>40 III</sub> zugeordnet (Spektren im Anh.). Exemplarisch sind in Abb. 6.5 partielle GC-Messläufe der resultierenden KW-Fractionen nach Hydrierung (im Vergleich mit dem Messlauf des thermophilen Crenarchaeons *S. solfataricus*) gezeigt.

Biphytane wurden in Spezies verschiedener Ordnungen beider Schwammklassen in quantitativ ähnlichen Verteilungen festgestellt. In allen Poriferen dominiert das C<sub>40 0</sub> diese Verbindungsklasse, gefolgt vom C<sub>40 II</sub> (PAPE *et al.*, 2004). Bemerkenswert sind die Unterschiede der GC-MS-Eigenschaften des C<sub>40 III</sub>



**Abbildung 6.5** Partielle GC-Läufe der KW-Fractionen nach Spaltung der Etherbindungen aus a) dem Crenarchaeum *S. solfataricus* sowie b) und c) den Poriferen *A. cf. mitsukuri* und *P. ventilabrum*. IS = interner Standard, \*) = Strukturzuordnung nach SINNINGHE DAMSTÉ *et al.* (2002b).

aus *S. solfataricus* und aus Schwämmen. Basierend auf der MS-Fragmentierung des C<sub>40 III</sub> aus Poriferen umfasst dieses einen für das Crenarchaeol charakteristischen Cyclohexylyring.

### 6.3 Zusammenfassende Diskussion der Lipide aus Archaea

Im einem Großteil der untersuchten Schwämme wurden Lipidbestandteile isoprenoider Struktur gefunden, für die gemeinhin Archaeen als Quellorganismen angenommen werden oder bekannt sind.

#### PME und Lycopan

Verschiedene Produzenten werden für die irregulären Isoprenoide PME und Lycopan, die in meist hohen Konzentrationen ungebunden in den Extrakten aller Hexactinellida und weniger Demospongiae auftreten, diskutiert. PME und ungesättigte Homologe wurden in Isolaten einiger methanogener Euryarchaeota, wie *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri* und *Methanlobus bombayensis* (HOLZER *et al.*, 1979; TORNABENE *et al.*, 1979; RISATTI *et al.*, 1984; SCHOUTEN *et al.*, 1997), beobachtet und unter Berücksichtigung geringer  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte an Standorten hoher CH<sub>4</sub>-Konzentrationen auch als Marker für methanotrophe Archaeen herangezogen (ELVERT *et al.*, 1999; THIEL *et al.*, 1999b; HINRICHS *et al.*, 2000; BIAN *et al.*, 2001; ORPHAN *et al.*, 2001). Basierend auf vergleichsweise schweren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des PME in Sedimentproben und partikulärem Material werden weitere (nicht methanogene) Quellen, wie z.B. phototrophe Mikroorganismen, diskutiert (KOHNNEN *et al.*, 1992; FREEMAN *et al.*, 1994).

Quellorganismen gesättigten Lycopans sind bis jetzt nicht bekannt. Da strukturell mögliche Vorläufermoleküle, wie funktionalisierte und ungesättigte Lycopan-Derivate, oder acyclische Carotenoide aus der Grünalge *Botryococcus braunii* bzw. phototrophen  $\gamma$ -Proteobakterien bekannt sind, werden phototrophe Organismen generell als Quelle für Lycopan in Erwägung gezogen (SMITH, 1988; WAKEHAM *et al.*, 1993; RAGER und METZGER, 2000). LATTUATI *et al.* (1998) beobachteten in einem thermophilen Angehörigen der Euryarchaeota ein Lycopadien. Aufgrund des Auftretens in CH<sub>4</sub>-beeinflussten Sedimenten oder der Koexistenz mit weiteren Markern für methanogene Archaeen wie PME vermuteten BRASSELL *et al.* (1981), dass Lycopan methanogenen Archaeen entstammt. Für die meisten untersuchten Poriferen kann hinsichtlich ihrer Standortbedingungen der Eintrag signifikanter PME- und Lycopangehalte durch phototrophe Organismen ausgeschlossen werden. Insbesondere für die Hexactinellida kann daher der gemeinsame Eintrag von PME und Lycopan durch Angehörige der Euryarchaeota angenommen werden. Diese Vermutung wird durch die Entdeckung von Gensequenzen der Euryarchaeota in der Demospongiae-Art *Rhopaloeides odorabile* unterstützt (WEBSTER *et al.*, 2001a).

#### Ethergebundenes Phytan und Biphytan

Die Anwesenheit von Archaeen in Poriferen wurde lipidchemisch erstmals durch die Analyse ethergebundener Isoprenoide, die ausschließlich in diesen Organismen auftreten, für ausgewählte Exemplare im Rahmen dieser Arbeit geklärt. Wie das Vorkommen von Biphytanen in verschiedenen Schwammtaxa zeigt, sind Archaeen in Schwämmen weiter verbreitet als bislang angenommen. Da diese Marker in verwandten Schwämmen oder Exemplaren gleichen Standorts fehlen, kann davon ausgegangen werden, dass die Biphytane in den untersuchten Poriferen nicht eingestrudelten pelagischen Archaeen entstammen, sondern auf schwammassoziierte Archaeen zurückzuführen sind.

Die Verteilungsmuster der acyclischen Biphytane und Homologe mit Cycloalkyleinheiten in den jeweiligen Schwämmen weisen große Ähnlichkeit zueinander und zu denen des schwammassoziierten Crenarchaeons *Cenarchaeum symbiosum* auf (DELONG *et al.*, 1998). Vor dem Hintergrund bekannter Lipidverteilungen in beiden Archaeenphyla zeigen die Befunde, dass die Population schwammassoziiertter Archaeen von Vertretern der Crenarchaeota dominiert wird. Im Vergleich zu dem aus *C. symbiosum* bekannten Biphytanprofil ist auffallend, dass in den Schwämmen das acyclische Biphytan C<sub>40 0</sub> im Verhältnis zu Homologen mit Ringen (C<sub>40 I</sub>, C<sub>40 II</sub> und C<sub>40 III</sub>) erhöht vorliegt. Diese Anteile des acyclischen Biphytans können mit einem zusätzlichen Beitrag durch Mitglieder der Euryarchaeota, für die die individuelle Synthese von C<sub>40</sub>-Isoprenoiden dieser Struktur dokumentiert ist, erklärt werden (TORNABENE und LANGWORTHY, 1978; GAMBACORTA *et al.*, 1994; GATTINGER *et al.*, 2002).

Die Anwesenheit des Archaeols in Schwämmen wurde in dieser Arbeit durch die Analyse des ethergebundenen Phytans in wenigen Exemplaren indirekt festgestellt. Phytan ist als ungebundener Bestandteil der Neutrallipidfraktion vieler Archaeen sowie als Teilstruktur des Archaeols bekannt (HOLZER *et al.*, 1979; TORNABENE *et al.*, 1979; BRASSELL *et al.*, 1981; LANGWORTHY, 1982; ROWLAND, 1990). Ferner ist Phytan ein Degradationsprodukt der Phytylseitenkette verschiedener Chlorophylltypen in zahlreichen phototrophen Bakterien und Pflanzen (DIDYK *et al.*, 1978; GILLAN und JOHNS, 1980). Aufgrund seines begrenzten Auftretens in Poriferen mit weiteren Archaeaetherlipiden kann Phytan hier als Spaltprodukt des Archaeols angesehen werden.

Da Archaeol nicht in weiteren Fraktionen der Schwammextrakte, die oftmals von bakteriellen oder eukaryotischen Lipiden dominiert werden, gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass Archaeen ein quantitativ untergeordneter Bestandteil der Mikroorganismengemeinschaft in den untersuchten Schwämmen sind. Diese Annahme wird durch die Abschätzung der Zellzahlen von Bakterien und Archaeen im Gewebe von *Phakellia ventilabrum* unterstützt (PAPE *et al.*, 2004). Mit Hilfe einer präzisen Fraktionierung des Schwammextraktes gelang BLUMENBERG (2003) jedoch der direkte Nachweis von Archaeol in *P. ventilabrum*.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Archaeen beider Phyla mit den angesetzten lipidklassenorientierten Methoden im Gewebe von Schwämmen nachgewiesen wurden. Die erzielten Ergebnisse können somit als Grundlage für die mikrobiologische Bearbeitung schwammassoziiertter Archaeen dienen. So führten Untersuchungen mit spezifischen Oligonukleotidsonden auf Grundlage dieser lipidchemischen Daten zur Visualisierung von Archaea im Gewebe des hexactinelliden *Sympagella* sp. 1 sowie der Demospongiae *Phakellia ventilabrum* und *Tentorium semisuberites* (pers. Mitteilung J. Reitner und F. Hoffmann).

## 7 Erweiterte Zusammenfassung und Ausblick

Schwämme (Klasse Porifera) sind seit dem Präkambrium fossil belegt und gelten als die ältesten Metazoen. In der interzellulären Matrix zahlreicher Schwammspezies finden sich dichte Populationen teilweise sehr spezifischer Mikroorganismen. Da Schwamm-Mikroben-Assoziationen in vielen erdgeschichtlichen Phasen als Riffbildner auftraten (BRUNTON und DIXON, 1994; RIDING und ZHURAVLEV, 1995), ist die Charakterisierung der Quellorganismen und des diagenetischen Schicksals von molekularen Zellbestandteilen aus Poriferen ein interessanter Aspekt der Organischen Geochemie. Ferner zeigten die Forschungsergebnisse der letzten Jahre, dass Poriferen oder ihre Assoziaten zu den potentesten Produzenten pharmakologisch aktiver Verbindungen zählen (PAWLIK, 1993; HAYGOOD *et al.*, 1999).

Etwa 50 Spezies der Porifera-Klassen Hexactinellida und Demospongiae global verteilter Kalt- und Tiefwasserlokationen wurden auf ihren Bestand an mikrobiellen Lipidbiomarkern untersucht. Ein großer Vorteil des Probenmaterials gegenüber dem aus Flachwassergebieten ist ein geminderter Eintrag durch phototrophe Organismen. Die Ergebnisse der im Beprobungsgebiet begleitend durchgeführten hydrochemischen Analysen weisen ebenfalls auf ganzjährig stabile Milieubedingungen auf dem Teil des mittelnorwegischen Schelfs hin, aus dem die überwiegende Anzahl der Poriferen stammt.

Zur Differenzierung estergebundener Komponenten bakterieller und eukaryotischer Lipide im Schwammextrakt wurden weiterhin etwa 50 Kultivate schwammassoziierter Bakterien der Proteobacteria- und Firmicutes-Gruppe auf ihr Fettsäure(FA)-Inventar überprüft. Es wurde beobachtet, dass Isolate der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien unter den gewählten Kulturbedingungen vornehmlich gesättigte und einfach ungesättigte lineare C<sub>12</sub>- bis C<sub>19</sub>-FA in für ihre Gattung typischen Verteilungsmustern synthetisieren. Wie auch in einer Reihe früherer Studien an Bakterienisolaten, wurden zahlreiche individuelle FA wie z.B. Hexadecen- und Octadecensäuren in vielen Bakterientaxa vorgefunden. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das Verhältnis dieser Komponenten die taxonomischen Differenzierung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien erlaubt.

Anhand des Inventars an Bakterienmembranfettsäuren wurde für die untersuchten Schwämme festgestellt, dass die traditionelle Einteilung der Poriferen in bakterienarm oder -reich (*sensu strictu*, Reiswig) mit Hilfe der Biomarkeranalyse semiquantitativ erfasst und differenziert werden kann (REISWIG, 1981). Wenngleich die Klasse der Hexactinellida im Vergleich mit den Demospongiae als eher bakterienarm anzusehen ist, wurden in beiden Klassen Spezies mit geringen bzw. dichten Bakterienpopulationen beobachtet. Insbesondere für die Angehörigen der Demospongiae wurde dokumentiert, dass weniger ihre phylogenetische Stellung als vielmehr ihr Habitus im Zusammenhang mit der Bakteriendichte steht. Mit wenigen Ausnahmen wurden relativ hohe Gehalte komplexer Gemische bakteriogener FA in kompakt gebauten Schwämmen großer Biomasse bzw. hohen Mesohylanteils beobachtet. Während sich die Profile von Bakterien-FA in diesen Schwämmen ähneln, unterscheiden sie sich generell von denen, die in früheren Studien von anderen Exemplaren berichtet wurden. Taxonomisch den bearbeiteten Individuen mit hohem Bakteriengehalt nahe stehende Spezies einfacherer Struktur, wie sie beispielsweise inkrustierende Schwämme besitzen, sind in vielen Fällen mit Bakteriengemeinschaften signifikant geringerer Dichte vergesellschaftet. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis  $n\text{-C}_{16:0}/n\text{-C}_{18:0}$  zur vorläufigen Beschreibung der Bakteriendichte in den untersuchten Kaltwasserschwämmen eignet.

In allen bakterienreichen Poriferen sind in Gram-negativen und -positiven Bakterien weit verbreitete Lipide wie divers strukturierte FA und verschiedene Hopanoide vorhanden. Die Lipidprofile kennzeichnen in diesen Schwämmen divers strukturierte Bakteriengemeinschaften. Weiterhin wurden in solchen Exemplaren mehrere Lipidklassen, die bis jetzt (I) keinem Produzenten zugeordnet werden konnten oder (II) lediglich in Bakterien anderer Biotope beobachtet wurden, in teilweise hohen Konzentrationen gefunden. Neben den Struktureigenschaften weist die Verteilung solcher Lipidbestandteile in den Demospongien darauf hin, dass sie bakteriogenen Ursprungs sind. Komplexe Isomerengemische mittkettig methylverzweigter FA, die mit dieser Komposition von keinem isolierten Bakterienstamm beschrieben wurden, sind mit bis über 50 % die dominante Substanzklasse kurzkettiger FA in allen *Bakterienschwämmen*. Für den astrophoriden Schwamm *Geodia macandrewii* wurde gezeigt, dass ein Großteil (67 Gew.-%) der mcb-C<sub>18:0</sub> in einer separaten Phospholipidfraktion estergebunden vorliegt. Basierend auf ihren strukturellen Eigenschaften werden Sulfat reduzierende  $\delta$ -Proteobakterien,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Proteobakterien oder Actinomycetales als Quellorganismen angenommen. Die Resultate der Analyse stabiler C-Isotope bewiesen für *Geodia barretti*, dass mittkettig methylverzweigte FA von Schwammzellen aufgenommen und verlängert werden.

Detaillierte Analysen zur Verteilung der Strukturen im Gewebe von *Geodia barretti* legten zusammen mit den Befunden simultan angesetzter histotechnologischer Verfahren anderer Bearbeiter die Vermutung nahe, dass die Produzenten einen (fakultativ) anaeroben Metabolismus betreiben. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der anhand früherer Untersuchungen anderer Forschergruppe aufgestellten Hypothese, dass methylverzweigte FA charakteristische Strukturen evolutionär primitiver Bakterien sind. Es ist aus diesem Grund zu vermuten, dass mcb-FA die Koevolution von Poriferen und assoziierten Bakterien widerspiegeln.

Monoalkylglyceroletherlipide, deren Alkyleinheiten 14 bis 19 C-Atome umfassen, deuten die Präsenz von Sulfat reduzierenden  $\delta$ -Proteobacteria oder Clostridia (Phylum Firmicutes) in bakterienreichen Schwämmen an. Ferner treten in diesen Exemplaren C<sub>29</sub>- bis C<sub>31</sub>-Dicarbonsäuren, die ebenfalls Signaturlipide anaerober Clostridia sind, in deutlichen Konzentrationen (bis 2 % der FAME-Fraktion) auf. Anhand der Biomarkeranalyse wurden somit mehrfach Hinweise auf O<sub>2</sub>-abgereicherte Kompartimente im Gewebe bakterienreicher Schwämme gewonnen.

In dieser Arbeit gelang erstmals der lipidchemische Nachweis von Archaeen als schwammassoziierte Mikroorganismen in zahlreichen Hexactinellida und mehreren Demospongiae. Die Verteilungsmuster ethergebundener, linearer C<sub>40</sub>-Isoprenoide (Biphytane) und Homologe mit einem bis drei Alkylingen deuten an, dass schwammassoziierte Archaeen vom Phylum der Crenarchaeota dominiert werden, und ein zusätzlicher Beitrag von Euryarchaeota entstammt. Wie das Vorkommen ungebundener Isoprenoid-KW in den Schwämmen zeigt, treten Archaeen bevorzugt in Schwämmen mit geringer Bakteriendichte wie in den meisten Hexactinellida und axinelliden Demospongien auf.

Die erzielten Resultate dienen als Grundlage einer gezielten mikrobiologischen Bearbeitung von Schwämmen im Hinblick auf biotechnologische Fragestellungen. Wie sich gezeigt hat, erfordert eine vollständige Charakterisierung des Mikroorganismeninventars die Kombination mehrerer konventioneller mikrobiologischer Methoden. Die zielorientierte Analyse der Lipide von Bakterien und Archaeen hat sich dagegen als wenig aufwändiges Verfahren erwiesen, das neben den rein qualitativen Befunden insbesondere quantitative Aussagen zu der Struktur der Bakterienpopulation

erlaubt. In dieser Arbeit wurden für viele Schwammexemplare deutliche Hinweise auf individuelle Taxa schwammassoziiertes Mikroorganismen gewonnen, die, wie Clostridia, Sulfat reduzierende Proteobacteria oder Archaea, bis jetzt nur sehr selten in mikrobiologischen Studien für andere Poriferen dokumentiert sind. Die Beobachtung, dass sich Angehörige der Clostridia und der Actinomycetales bislang als bedeutende Lieferanten hoch aktiver Sekundärmetaboliten herausgestellt haben, unterstreicht somit die Relevanz der Biomarkeranalyse in Schwämmen.



## 8 Literatur

- Abraham W.-R., Meyer H., Lindholm S., Vancanneyt M., und Smit J. (1997) Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter sensu lato*, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 522-539.
- Adams C. L., McInerney J. O., und Kelly M. (1999) Indications of relationships between poriferan classes using full-length 18S rRNA gene sequences. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 33-43.
- Addlesee H. A. und Hunter C. N. (1999) Physical mapping and functional assignment of the geranylgeranyl-Bacteriochlorophyll reductase gene, *bchP*, of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **181**, 7248-7255.
- Aiello A., Fattorusso E., und Menna M. (1999) Steroids from sponges: Recent reports. *Steroids* **64**, 687-714.
- Akagawa-Matsushita M., Matsuo M., Koga Y., und Yamasato K. (1992) *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 621-627.
- Aloisi G., Bouloubassi I., Heijs S. K., Pancost R. D., Pierre C., Sinninghe Damsté J. S., Gottschal J. C., Forney L. J., und Rouchy J. M. (2002) CH<sub>4</sub>-consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps. *Earth Planet. Sci. Lett.* **203**, 195-203.
- 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.
- Amon R. M. W., Budéus G., und Meon B. (2003) Dissolved organic carbon distribution and origin in the Nordic Seas: Exchanges with the Arctic Ocean and the North Atlantic. *J. Geophys. Res.* **108**, 14/1-14/17.
- Archer D., Peltzer E. T., und Kirchman D. L. (1997) A timescale for dissolved organic carbon production in equatorial Pacific surface waters. *Global Biogeochem. Cycles* **11**, 435-452.
- Aries E., Doumenq P., Artaud J., Acquaviva M., und Bertrand J. C. (2001) Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria. *Org. Geochem.* **32**, 891-903.
- Asselineau C. und Asselineau J. (1989) Analyse lipidique en taxonomie bactérienne: proposition d'une méthode standardisée. *Biochemistry and Cell Biology* **68**, 379-386.
- Ayanoglu E., Popov S., Kornprobst J. M., Aboud-Bichara A., und Djerassi C. (1983) Phospholipid studies of marine organisms: V. New alpha-methoxy acids from *Higginsia tethyoides*. *Lipids* **18**, 830-836.
- Ayanoglu E., Walkup R. D., Sica D., und Djerassi C. (1982) Phospholipid studies of marine organisms: III. New phospholipid fatty acids from *Petrosia ficiformis*. *Lipids* **17**, 614-625.
- Baldauf S. L., Palmer J. D., und Doolittle W. F. (1996) The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7749-7754.
- Balkwill D. L., Murphy E. M., Fair D. M., Ringelberg D. B., und White D. C. (1998) Microbial communities in high and low recharge environments: Implications for microbial transport in the vadose zone. *Microb. Ecol.* **35**, 156-171.
- Ballio A. und Barcellona S. (1971) Identification of 10-methyl branched fatty acids in *Microbispora parva* by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Gazzetta Chimica Italiana* **101**, 635-636.
- Barnathan G., Bourgougnon N., und Kornprobst J.-M. (1998) Methoxy fatty acids isolated from the red alga, *Schizymenia dubyi*. *Phytochemistry* **47**, 761-765.
- Barnathan G., Doumenq P., Njinkoue J.-M., Miralles J., Debitus C., Levi C., und Kornprobst J.-M. (1994) Sponge fatty acids. 3. Occurrence of series of n-7 monoenoic and iso-5,9 dienoic long-chain fatty acids in the phospholipids of the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei* Keller<sup>1</sup>. *Lipids* **29**, 297-303.
- Barnathan G., Miralles J., Gaydou E. M., Boury-Esnault N., und Kornprobst J.-M. (1992) New phospholipid fatty acids from the marine sponge *Cinachyrella alloclada* Uliczka. *Lipids* **27**, 779-784.
- Barnes A., Galbraith L., und Wilkinson S. B. (1989) The presence of 11-methyloctadec-11-enoic acid in the extractable lipids of *Pseudomonas vesicularis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**, 101-106.
- Barns S. M., Delwiche C. F., Palmer J. D., und Pace N. R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9188-9193.



## Literatur

---

- Baumann P., Baumann L., Bowditch R. D., und Beaman B. (1984) Taxonomy of *Alteromonas*: *A. nigrifaciens* sp. nov., nom. rev.; *A. macleodii*; and *A. haloplanktis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 145-149.
- Behme R. J., Shuttleworth R., McNabb A., und Colby W. D. (1996) Identification of Staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 3075-3084.
- Béjà O., Suzuki M. T., Heidelberg J. F., Nelson W. C., Preston C. M., Hamada T., Eisen J. A., Fraser C. M., und DeLong E. F. (2002) Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**, 630-633.
- Bergquist P. R., Lawson M. P., Lavis A., und Cambie R. C. (1984) Fatty acid composition and the classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**, 63-84.
- Bertone S., Giacomini M., Ruggiero C., Piccarolo C., und Calegari L. (1996) Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2122-2132.
- Bewley C. A. und Faulkner D. J. (1998) Steinschwämme: Stars unter den Naturstoffproduzenten oder Wirte der Stars? *Angew. Chem.* **110**, 2280-2297.
- 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**, 716-723.
- Bian L., Hinrichs K.-U., Xie T., Brassell S. C., Iversen N., Fossing H., Jørgensen B. B., und Hayes J. M. (2001) Algal and archaeal polyisoprenoids in a recent marine sediment: Molecular isotopic evidence for anaerobic oxidation of methane. *Geochem. Geophys. Geosyst.* **2**.
- Bird C. W., Lynch J. M., Pirt S. J., Reid W. W., Brooks C. J. W., und Middleditch B. S. (1971) Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on methane. *Nature* **230**, 473-474.
- Bisseret P., Zundel M., und Rohmer M. (1985) Prokaryotic triterpenoids. 2. 2 $\beta$ -methylhopanoids from *Methylobacterium organophilum* and *Nostoc muscorum*, a new series of prokaryotic triterpenoids. *Eur. J. Biochem.* **150**, 29-34.
- Bligh E. G. und Dyer W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.
- Blindheim J. (1990) Arctic intermediate water in the Norwegian Sea. *Deep-Sea Res.* **37**, 1475-1485.
- Bloch K., Baronowsky P. E., Goldfine H., Lennarz W. J., Light R., Norris A. T., und Scheuerbrandt G. (1961) Symposium on lipid metabolism. Biosynthesis and metabolism of unsaturated fatty acids. *Federation Proceedings* **20**, 921-927.
- Blumenberg M. (2003) Biomarker aus Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämmen. Dissertation, Universität Hamburg. Hamburg.
- Blumenberg M., Thiel V., Pape T., und Michaelis W. (2002) The steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 415-419.
- Bobbie R. J. und White D. C. (1980) Characterization of benthic microbial community structure by high resolution gas chromatography of fatty acid methyl ester. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1212-1222.
- Bondevik S., Svendsen J. I., und Mangerud J. (1997) Tsunami sedimentary facies deposited by the Storegga tsunami in shallow marine basins and coastal lakes, western Norway. *Sedimentology* **44**, 1115-1131.
- Boon J. J., De Leeuw J. W., van de Hoek G. J., und Vosjan J. H. (1977) Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched  $\beta$ -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.* **129**, 1183-1191.
- Borchiellini C., Boury-Esnault N., Vacelet J., und Le Parco Y. (1998) Phylogenetic analysis of the Hsp 70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 647-655.
- Bouvier P., Rohmer M., Benveniste P., und Ourisson G. (1976)  $\Delta^{8(14)}$ -Steroids in the Bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Biochem. J.* **159**, 267-271.
- Bowman J. P., Skerratt J. H., Nichols P. D., und Sly L. I. (1991) Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**, 15-22.
- Brachert T. C. (1991) Environmental control on fossilization of siliceous sponge assemblages: A proposal. In *Fossil and recent sponges* (ed. J. Reitner und H. Keupp), Springer-Verlag, Berlin. pp. 542-553

- Brasier M., Green M., und Shields G. (1997) Ediacarian sponge spicule clusters from southwestern Mongolia and the origins of the Cambrian fauna. *Geology* **25**, 303-306.
- Brassell S. C., Eglinton G., und Maxwell J. R. (1983) The geochemistry of terpenoids and steroids. *Biochemical Society Transactions* **11**, 575-586.
- Brassell S. C., Wardroper A. M. K., Thomson I. D., Maxwell J. R., und Eglinton G. (1981) Specific acyclic isoprenoids as biological markers of methanogenic bacteria in marine sediments. *Nature* **290**, 693-696.
- Brennan P. J. (1988) Mycobacterium and other actinomycetes. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 203-298
- Brenner D. J., Hollis D. G., Moss C. W., English C. K., Hall G. S., Vincent J., Radosevic J., Birkness K. A., Bibb W. F., Quinn F. D., Swaminathan B., Weaver R. E., Reeves M. W., O'Connor S. P., Hayes P. S., Tenover F. C., Steigerwalt A. G., Perkins B. A., Daneshvar M. I., Hill B. C., Washington J. A., Woods T. C., Hunter S. B., Hadfield T. L., Ajello G. W., Kaufmann A. F., Wear D. J., und Wenger J. D. (1991) Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the cleveland clinic foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2450-2460.
- Brissette J. L., Cabacungan E. A., und Pieringer R. A. (1986) Studies on the antibacterial activity of dodecylglycerol. Its limited metabolism and inhibition of glycerolipid and lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus mutans* BHT. *J. Biol. Chem.* **261**, 6338-6345.
- Britschgi T. B. und Giovannoni S. J. (1991) Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1707-1713.
- Brochier C. und Philippe H. (2002) A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature* **417**, 244.
- Brocks J. J., Logan G. A., Buick R., und Summons R. E. (1999) Archaean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* **285**, 1033-1036.
- Broecker W. S. und Peng T.-H. (1982) *Tracers in the sea*. Columbia University, Lamont-Doherty Geological Observatory. New York. pp.1-690
- Brooks J. M., Kennicutt II M. C., Fisher C. R., Macko S. A., Cole K., Childress J. J., Bidigare R. R., und Vetter R. D. (1987) Deep-sea hydrocarbon seep communities: evidence for energy and nutritional carbon sources. *Science* **238**, 1138-1142.
- Brown A. S., Cho K. Y., Cheung H. T. A., Hemmens V., und Vine J. (1985) Determination of fatty acids of the bacteria *Streptomyces* R61 and *Actinomadura* R39 by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **341**, 139-145.
- Brunton F. R. und Dixon O. A. (1994) Siliceous sponge-microbe biotic associations and their recurrence through the Phanerozoic as reef mound constructors. *Palaios* **9**, 370-387.
- Bugge T., Befring S., Belderson R. H., Eidvin T., Jansen E., Kenyon N. H., Høltedahl H., und Sejrup H. P. (1987) A giant three-stage submarine slide off Norway. *Geo-Marine Letters* **7**, 191-198.
- Bugge T., Knarud R., und Mørk A. (1984) Bedrock geology on the mid-Norwegian continental shelf. In *Petroleum geology of the North European Margin* (ed. A. Spencer, S. O. Johnsen, A. Mørk, E. Nysaether, P. Songstad, und A. Spinnangr), Norwegian Petroleum Society. London (Graham & Trotman). pp. 271-283
- Bultel-Poncé V., Berge J.-P., Debitus C., Nicolas J.-L., und Guyot M. (1999) Metabolites from the sponge-associated bacterium *Pseudomonas* species. *Mar. Biotechnol.* **1**, 384-390.
- Bultel-Poncé V., Debitus C., Berge J.-P., Cerceau C., und Guyot M. (1998) Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 233-236.
- Burdette D. S., Jung S.-H., Shen G.-J., Hollingsworth R. I., und Zeikus J. G. (2002) Physiological function of alcohol dehydrogenases and long-chain (C<sub>30</sub>) fatty acids in alcohol tolerance of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1914-1918.
- Burggraf S., Jannasch H. W., Nicolaus B., und Stetter K. O. (1990) *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 24-28.
- Burhan R. Y. P., Trendel J.-M., Adam P., Wehrung P., Albrecht P., und Nissenbaum A. (2002) Fossil bacterial ecosystem at methane seeps: Origin of organic matter from Be'eri sulfur deposit, Israel. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 4085-4101.

- Burja A. M., Webster N. S., Murphy P. T., und Hill R. T. (1999) Microbial symbionts of Great Barrier reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 63-75.
- Buser H. R., Arn H., Guerin P., und Rauscher S. (1983) Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfides adducts. *Anal. Chem.* **55**, 818-822.
- Campbell I. M. und Naworal J. (1969) Composition of the saturated and monounsaturated fatty acids of *Mycobacterium phlei*. *J. Lipid Res.* **10**, 593-598.
- Capon R. J. (2001) Marine bioprospecting - trawling for treasure and pleasure. *Eur. J. Org. Chem.* **4**, 633-645.
- Carballeira N. und Pagan M. (2000) Identification and total synthesis of a novel dimethylated fatty acid from the Caribbean sponge *Calyx podatypa*. *J. Nat. Prod.* **63**, 666-669.
- Carballeira N., Thompson J. E., Ayanoglu E., und Djerassi C. (1986) Biosynthetic studies of marine lipids. 5. The biosynthesis of long-chain branched fatty acids in marine sponges. *J. Org. Chem.* **51**, 2751-2756.
- Carballeira N. M., Colón R., und Emiliano A. (1998a) Identification of 2-methoxyhexadecanoic acid in *Amphimedon compressa*. *J. Nat. Prod.* **61**, 675-676.
- Carballeira N. M. und Maldonado M. E. (1988) 7-Methyl-8-hexadecenoic acid: a novel fatty acid from the marine sponge *Desmapsama anchorata*. *Lipids* **23**, 690-693.
- Carballeira N. M. und Maldonado M. E. (1989a) New phospholipid fatty acids from the caribbean sponge *Ectyoplasia ferox*. *Lipids* **24**, 371-374.
- Carballeira N. M. und Maldonado M. E. (1989b) On the isolation of the new fatty acid 6,11-eicosadienoic (20:2) and related 6,11-dienoic acids from the sponge *Euryspongia rosea*. *Lipids* **24**, 665-668.
- Carballeira N. M. und Medina J. R. (1994) New  $\Delta$ 5,9 fatty acids in the phospholipids of the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1688-1695.
- Carballeira N. M., Miranda C., Lozano C. M., Nechev J. T., Ivanova A., Ilieva M., Tzvetkova I., und Stefanov K. (2001) Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. *J. Nat. Prod.* **64**, 256-259.
- Carballeira N. M., Negron V., und Reyes E. D. (1992) Novel naturally occurring  $\alpha$ -methoxy acids from the phospholipids of Caribbean sponges. *Tetrahedron* **48**, 1053-1058.
- Carballeira N. M. und Pagán M. (2001) New methoxylated fatty acids from the Caribbean sponge *Callyspongia fallax*. *J. Nat. Prod.* **64**, 620-623.
- Carballeira N. M., Pagán M., Shalabi F., J.T. N., Lahtchev K., Ivanova A., und Stefanov K. (2000) Two novel *iso*-branched octadecenoic acids from a *Micrococcus* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 1573-1575.
- Carballeira N. M., Pagan P., und Rodriguez A. D. (1998b) Identification and total synthesis of novel fatty acids from the Caribbean sponge *Calyx podatypa*. *J. Nat. Prod.* **61**, 1049-1052.
- Carballeira N. M. und Reyes E. D. (1990) Identification of the new 23-methyl-5,9-pentacosadienoic acid in the sponge *Cribrochalina vasculum*. *Lipids* **25**, 69-71.
- Carballeira N. M., Reyes E. D., Sostre A., Rodriguez A. D., Rodriguez A. D., und Gonzales F. A. (1997a) Identification of the novel antimicrobial fatty acid (5Z,9Z)-14-methyl-5,9-pentadecadienoic acid in *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* **60**, 502-504.
- Carballeira N. M., Reyes M., Sostre A., Huang H., Verhagen M. F. J. M., und M.W.W. A. (1997b) Unusual fatty acid compositions of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and the bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol.* **179**, 2766-2768.
- Carballeira N. M. und Sepulveda J. A. (1992) Two novel naturally occurring  $\alpha$ -methoxy acids from the phospholipids of two Caribbean sponges. *Lipids* **27**, 72-74.
- Carballeira N. M. und Shalabi F. (1990) Identification of naturally occurring *trans*, *trans*  $\Delta$ 5,9 fatty acids from the sponge *Plakortis halichondroides*. *Lipids* **25**, 835-840.
- Cardellina II J. H., Graden C. J., und Greer B. J. (1983) 17Z-Tetracosenyl 1-glycerol ether from the sponges *Cinachyra alloclada* and *Ulosa ruetzleri*. *Lipids* **18**, 107-110.
- Cary S. C., Fisher C. R., und Felbeck H. (1988) Mussel growth supported by methane as sole carbon and energy source. *Science* **240**, 78-80.
- Castro H. F., Williams N. H., und Ogram A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**, 1-9.

- Cavalier-Smith T., Allsopp M. T. E. P., Chao E. E., Boury-Esnault N., und Vacelet J. (1996) Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.* **74**, 2031-2045.
- Cavicchioli R., Siddiqui K. S., Andrews D., und Sowers K. R. (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 253-261.
- Cavigelli M. A., Robertson G. P., und Klug M. J. (1995) Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant and Soil* **170**, 99-113.
- Cerrano C., Arillo A., Bavestrello G., Calcinai B., Cattaneo-Vietti R., Penna A., Sarà M., und Totti C. (2000) Diatom invasion in the antarctic hexactinellid sponge *Scolymastra joubini*. *Polar Biol.* **23**, 441-444.
- Chaffee A. L. und Johns R. B. (1985) Aliphatic components of Victorian brown coal lithotypes. *Org. Geochem.* **8**, 349-365.
- Chappe B., Albrecht P., und Michaelis W. (1982) Polar lipids of archaeobacteria in sediments and petroleum. *Science* **217**, 65-66.
- Chen G., Wang G., Li X., Waters B., und Davies J. (2000) Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *Journal of Antibiotics* **53**, 114-115.
- Cheng X. C., Jensen P. R., und Fenical W. (1999) Luisols A and B, new aromatic tetraols produced by an estuarine marine bacterium of the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). *J. Nat. Prod.* **62**, 608-610.
- Chill L., Miroz A., und Kashman Y. (2000) Haliclonyne, a new highly oxygenated polyacetylene from the marine sponge *Haliclona* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 523-526.
- Chou S., Haddad A., Paul N. R., und Kasatiya S. (1996) Direct identification of *Mycobacterium* species in Bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1317-1320.
- Christie W. W., Brechany E. Y., Stefanov K., und Popov S. (1992) The fatty acids of the sponge *Dysidea fragilis* from the Black Sea. *Lipids* **27**, 640-644.
- Chun J., Bae K. S., Moon E. Y., Jung S.-O., Lee H.-K., und Kim S.-J. (2000) *Nocardioopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **50**, 1909-1913.
- Chun J., Seong C.-N., Bae K. S., Lee K.-J., Kang S.-O., Goodfellow M., und Hah Y. C. (1998) *Nocardia flavorosea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **48**, 901-905.
- Clark R. J., Garson M. J., und Hooper J. N. A. (2001) Antifungal alkyl amino alcohols from the tropical marine sponge *Haliclona* n. sp. *J. Nat. Prod.* **64**, 1568-1571.
- Clarke N. G., Hazlewood G. P., und Dawson A. G. (1980) Structure of diabolic acid-containing phospholipids isolated from *Butyrivibrio* sp. *Biochem. J.* **191**, 561-569.
- Colquhoun J. A., Heald S. C., Li L., Tamaoka J., Kato C., Horikoshi K., und Bull A. T. (1998) Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* **2**, 269-277.
- Compagnone R. S., Piña I. C., Rangel H. R., Dagger F., Suárez A. I., Venkata Rami Reddy M., und Faulkner D. J. (1998) Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*. *Tetrahedron* **54**, 3057-3068.
- Conway Morris S. (1993) The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* **361**, 219-225.
- Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C., und Mangoni A. (2000) The first 12-methylhopanoid: 12-Methylbacteriohopanetetrol from the marine sponge *Plakortis simplex*. *Tetrahedron* **56**, 3781-3784.
- Cottrell M. T. und Kirchman D. L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5116-5122.
- Cvejic J. H., Bodrossy L., Kóvacs K. L., und Rohmer M. (2000a) Bacterial triterpenoids of the hopane series from the methanotrophic bacteria *Methylocaldum* spp.: phylogenetic implications and first evidence for an unsaturated aminobacteriohopanepolyol. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 361-365.
- Cvejic J. H., Putra S. R., El-Beltagy A., Hattori R., Hattori T., und Rohmer M. (2000b) Bacterial triterpenoids of the hopane series as biomarkers for the chemotaxonomy of *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Ralstonia* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 295-299.
- Dasgupta A., Ayanoglu E., und Djerassi C. (1984) Phospholipid studies of marine organisms: New branched fatty acids from *Strongylophora durissima*. *Lipids* **19**, 768-776.

- Dawson A. G., Long D., and Smith D. E. (1988) The Storegga slides: evidence from eastern Scotland for a possible tsunami. *Mar. Geol.* **82**, 271-276.
- De Rosa M., Esposito E., Gambacorta A., Nicolaus B., and Bu'Lock J. D. (1980) Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella acidophila*. *Phytochemistry* **19**, 827-831.
- De Rosa M. and Gambacorta A. (1988) The lipids of archaeobacteria. *Progress in Lipid Research* **27**, 153-175.
- De Rosa M., Gambacorta A., Huber R., Lanzotti V., Nicolaus B., Stetter K. O., and Trincone A. (1988) A new 15,16-Dimethyl-30-glyceroyloxytriacontanoic acid from lipids of *Thermotoga maritima*. *Journal of the Chemical Society* **19**, 1300-1301.
- De Rosa M., Gambacorta A., Minale L., and Bu'Lock J. D. (1973) Isoprenoids of *Bacillus acidocaldarius*. *Phytochemistry* **12**, 1117-1123.
- De Rosa M., Gambacorta A., Nicolaus B., Chappe B., and Albrecht P. (1983) Isoprenoid ethers; backbone of complex lipids of the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochim. Biophys. Acta* **753**, 249-256.
- De Rosa M., Trincone A., Nicolaus B., and Gambacorta A. (1991) Archaeobacteria: lipids, membrane structures, and adaptation to environmental stresses. In *Life Under Extreme Conditions* (ed. G. Di Prisco), Springer-Verlag, Berlin. pp. 61-87
- De Rosa S., Milone A., Kujumgiev A., Stefanov K., Nechev I., and Popov S. (2000) Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas / Alteromonas*, associated with the sponge *Dysidea fragilis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **126**, 391-396.
- Debitus C., Guella G., Mancini I., Waikedre J., Guemas J.-P., Nicolas J.-L., and 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.
- Debrenne F. (1999) The past of sponges - sponges of the past. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 9-21.
- Deckert G., Warren P. V., Gaasterland T., Young W. G., Lenox A. L., Graham D. E., Overbeek R., Snead M. A., Keller M., Aujay M., Huber R., Feldman R. A., Short J. M., Olsen G. J., and Swanson R. V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**, 353-358.
- DeLong E. F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685-5689.
- DeLong E. F., Franks D. G., and Alldredge A. L. (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* **38**, 924-934.
- DeLong E. F., King L. L., Massana R., Cittone H., Murray A., Schleper C., and Wakeham S. G. (1998) Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic Crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1133-1138.
- DeLong E. F., Taylor L. T., Marsh T. L., and Preston C. M. (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic Archaea and Bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5554-5563.
- DeLong E. F., Wu K. Y., Prézelin B. B., and Jovine R. V. M. (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**, 695-697.
- Dembitsky V. M., Gorina I. A., Federova I. P., and Solovieva V. (1989) Comparative investigation of plasmalogens, alkylacyl, and diacyl glycerophospholipids of the marine sponges (type Porifera, Class Demospongiae). *Comp. Biochem. Physiol. B* **92**, 733-736.
- Dembitsky V. M., Rezanka T., and Kashin A. G. (1993) Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal - II. Unusual lipid composition of two sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia intermedia* (Family Lubomirskiidae, Class Demospongiae). *Comp. Biochem. Physiol. B* **106B**, 825-831.
- Dembitsky V. M., Shkrob I., and Go J. V. (2001) Dicarboxylic and fatty acid compositions of cyanobacteria of the genus *Aphanizomenon*. *Biochemistry (Moscow)* **66**, 72-76.
- Didyk B. M., Simoneit B. R. T., Brassell S. C., and Eglinton G. (1978) Organic geochemical indicators of palaeoenvironmental conditions of sedimentation. *Nature* **272**, 216-222.
- Diefenbach R. and Keweloh H. (1994) Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. *Arch. Microbiol.* **162**, 120-125.
- Djerassi C. and Lam W.-K. (1991) Sponge phospholipids. *Acc. Chem. Res.* **24**, 69-75.
- Djerassi C. and Silva C. J. (1991) Sponge sterols: Origin and biosynthesis. *Acc. Chem. Res.* **24**, 371-378.

- Do M. N. und Erickson K. L. (1983) Branched chain mono-glycerol ethers from a taiwanese marine sponge of the genus *Aaptos*. *Tetrahedron Lett.* **24**, 5699-5702.
- DOE. (1994) *Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water*. pp.74
- Dons C. (1944) Norges korallrev. *Det Kongelige Norske Videnskabers Selskab, Forhandling* **16**, 37-82.
- Dosse G. (1939) Bakterien und Pilzbefunde sowie pathologische und Fäulnisvorgänge in Meeres- und Süßwasserschwämmen. Untersuchungen im Zusammenhang mit dem gegenwärtigen Sterben der Badeschwämme in Westindien. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **11**, 331-356.
- Douglas A. G., Blumer M., Eglinton G., und Douraghi-Zadeh K. (1971) Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of naturally-occurring acyclic isoprenoid carboxylic acids. *Tetrahedron* **27**, 1071-1092.
- Douka E., Koukkou A.-I., Drainas C., Grosdemange-Billiard C., und Rohmer M. (2001) Structural diversity of the triterpenic hydrocarbons from the bacterium *Zymomonas mobilis*: the signature of defective squalene cyclization by the squalene/hopene cyclase. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 247-251.
- Doumenq P., Acquaviva M., Asia L., Durbec J. P., Le Dréau Y., Mille G., und Bertrand J. C. (1999) Changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in response to *n*-eicosane as carbon source and various culture conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**, 151-161.
- Dowling N. J. E., Nichols P. D., und White D. C. (1988) Phospholipid fatty acid and infra-red spectroscopic analysis of a sulphate-reducing consortium. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**, 325-334.
- Duque C., Cepeda N., und Martinez A. (1993) The steryl ester and phospholipid fatty acids of the sponge *Agelas conifera* from the Colombian Caribbean. *Lipids* **28**, 767-769.
- Edlund A., Nichols P. D., Roffey R., und White D. C. (1985) Extractable and lipopolysaccharid fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species. *J. Lipid Res.* **26**, 982-988.
- Egge H. (1983) Mass spectrometry of ether lipids. In *Ether lipids - Biochemical and biomedical aspects* (ed. H. K. Mangold und F. Paltauf), Academic Press. New York. pp. 17 - 47
- Ehrenberg S. N., Skjevraak I., und Gilje A. E. (1995) Asphaltene-rich residues in sandstone reservoirs of Haltenbanken province, mid-Norwegian continental shelf. *Marine and Petroleum Geology* **12**, 53-69.
- Eide L. I. (1979) Evidence of a topographically trapped vortex on the Norwegian continental shelf. *Deep-Sea Res.* **26**, 601-621.
- Eilers H., Pernthaler J., Peplies J., Glöckner F. O., Gerdts G., und Amann R. (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5134-5142.
- Eimhjellen K. E. (1967) Photosynthetic bacteria and carotenoids from a sea sponge *Halichondrium panicea*. *Acta Chem. Scand., Ser. A* **21**, 2280-2281.
- Elferink M. G. L., de Wit J. G., Driessen A. J. M., und Konings W. N. (1994) Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1193**, 247-254.
- Elvert M., Suess E., und Whiticar M. J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates. Superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C20 and C25 irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**, 295-300.
- Elyakov G. B., Kuznetsova T. A., Mikhailov V. V., Maltsev I. I., Voinov V. G., und Fedoreyev S. A. (1991) Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia* **47**, 632-633.
- Embley T. M., Wait R., Dobson G., und Goodfellow M. (1987) Fatty acid composition in the classification of *Saccharopolyspora hirsuta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**, 131-135.
- Erpenbeck D., Breeuwer J. A. J., van der Velde H. C., und van Soest R. W. M. (2002) Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Mar. Biol.* **141**, 377-386.
- Fang J., Barcelona M. J., und Alvarez P. J. J. (2000) A direct comparison between fatty acid analysis and intact phospholipid profiling for microbial identification. *Org. Geochem.* **31**, 881-887.
- Farrimond P., Griffiths T., und Evdokiadis E. (2002) Hopanoic acids in Mesozoic sedimentary rocks: their origin and relationship with hopanes. *Org. Geochem.* **33**, 965-977.

- Farrimond P., Head I. M., and Innes H. E. (2000) Environmental influence on the biohopanoid composition of recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**, 2985-2992.
- Farrimond P., Taylor A., and Telnæs N. (1998) Biomarker maturity parameters: the role of generation and thermal degradation. *Org. Geochem.* **29**, 1181-1197.
- Farrimond P. und Telnæs N. (1996) Three series of rearranged hopanes in Toarcian sediments (northern Italy). *Org. Geochem.* **25**, 165-177.
- Faulkner D. J. (2000) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 7-55.
- Faulkner D. J. (2002) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 1-48.
- Federle T. W. (1986) Microbial distribution in soil - new techniques. In *Perspectives in microbial ecology* (ed. F. Megusar und M. Ganthar), Slovene society for microbiology. Ljubljana. pp. 493-498
- Feio M. J., Beech W. B., Carepo M., Lopes J. M., Cheung C. W. S., Franco R., Guezennec J., Smith J. R., Mitchell J. I., Moura J. J. G., und Lino A. R. (1998) Isolation and characterisation of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* genus. *Anaerobe* **4**, 117-130.
- Fenical W. (1993) Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Chem. Rev.* **93**, 1673-1683.
- Feulgen R. und Voit K. (1924) Aldehyde of wide distribution; its origin, its microchemical, and microscopical detection. *Pfluegers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **206**, 389-410.
- Findlay J. A., Fell J. W., Coleman N. K., und Vestal J. R. (1986) Biochemical indicators of the role of fungi and thraustochytrids in mangrove detrital systems. In *The biology of marine fungi* (ed. S. T. Moss), Cambridge University Press. Cambridge. pp. 91-104
- Fitz W. und Arigoni D. (1992) Biosynthesis of 15,16-dimethyltriacontanedioic acid (diabolic acid) from [16-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]- and [14-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-palmitic acids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1533-1534.
- Flowers A. E., Garson M. J., Webb R. I., Dumdei E. J., und Charan R. D. (1998) Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell and Tissue Research* **292**, 597-607.
- Förster H. J., Biemann K., Haigh W. G., Tattrie N. H., und Colvin J. R. (1973) The structure of novel C<sub>35</sub> pentacyclic terpenes from *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* **135**, 133-143.
- Fowler M. G. und Douglas A. G. (1987) Saturated hydrocarbon biomarkers in oils of Late Precambrian age from Eastern Siberia. *Org. Lett.* **11**, 201-213.
- Frederiksen R., Jensen A., und Westerberg H. (1992) The distribution of the scleractinian coral *Lophelia pertusa* around the Faroe Islands and the relation to internal tidal mixing. *Sarsia* **77**, 157-171.
- Freeman K. H., Hayes J. M., Trendel J.-M., und Albrecht P. (1990) Evidence from carbon isotope measurements for diverse origins of sedimentary hydrocarbons. *Nature* **343**, 254-256.
- Freeman K. H., Wakeham S. G., und Hayes J. M. (1994) Predictive isotopic biogeochemistry: Hydrocarbons from anoxic marine basins. *Org. Geochem.* **21**, 629-644.
- Freiwald A. (1998) Geobiology of *Lophelia pertusa* (scleractinia) reefs in the north atlantic. Habilitationsschrift, Universität Bremen. Bremen.
- Freiwald A., Hühnerbach V., Lindberg B., Wilson J. B., und Campbell J. (2002) The Sula Reef Complex, Norwegian shelf. *Facies* **47**, 179-200.
- Freiwald A., Wilson J. B., und Henrich R. (1999) Grounding Pleistocene icebergs shape recent deep-water coral reefs. *Sediment. Geol.* **125**, 1-8.
- Friedrich A. B., Fischer I., Proksch P., Hacker J., und Hentschel E. (2001) Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**, 105-113.
- Friedrich A. B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P., und Hentschel U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina caverincola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar. Biol.* **134**, 461-470.
- Fuerst J. A., Hawkins J. A., Holmes A., Sly L. I., Moore C. J., und Stackebrandt E. (1993) *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 125-134.

- Fuerst J. A., Webb R. I., Garson M. J., Hardy L., und Reisinger H. M. (1999) Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 193-203.
- Fuhrman J. A. und Davis A. A. (1997) Widespread Archaea and novel Bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **150**, 275-285.
- Fuhrman J. A., McCallum K., und Davis A. A. (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**, 148-149.
- Fuhrman J. A., McCallum K., und Davis A. A. (1993) Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the atlantic and pacific oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1294-1302.
- Fulco A. J. (1967) The effect of temperature on the formation of  $\Delta^5$ -unsaturated fatty acids by Bacilli. *Biochim. Biophys. Acta* **144**, 701-703.
- Fulco A. J. (1969) Biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. I. Temperature induction of the desaturation reaction. *J. Biol. Chem.* **244**, 889-895.
- Fulco A. J., Levy R., und Bloch K. (1964) The biosynthesis of  $\Delta^9$ - and  $\Delta^5$ -monosaturated fatty acids by bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* **239**, 998-1003.
- Fusetani N. (1996) Bioactive substances from marine sponges. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* **15**, 157-170.
- Gabriel J. L. und Chong P. L. G. (2000) Molecular modeling of archaeobacterial bipolar tetraether lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **105**, 193-200.
- Gallacher S. und Birkbeck T. H. (1993) Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3981-3983.
- Gallisian M. F. und Vacelet J. (1976) Ultrastructure de quelques stades de l'ovogenèse de spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *Annales des Sciences Naturelles (Zoologie)* **18**, 381-404.
- Gambacorta A., Trincone A., Nicolaus B., Lama L., und De Rosa M. (1994) Unique features of lipids of *Archaea*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 518-527.
- Garrity G. M., Winters M., und Searles D. B. (2001) Taxonomic outline of the procaryotic genera. <http://www.cme.msu.edu/bergeys/april2001-genus.pdf>.
- Garson M. J. (1993) The biosynthesis of marine natural products. *Chem. Rev.* **93**, 1699-1733.
- Garson M. J., Flowers A. E., Webb R. I., Charan R. D., und McCaffrey E. J. (1998) A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: Cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient fractionation. *Cell Tissue Res.* **293**, 365-373.
- Garson M. J., Zimmermann M. P., Battershill C. N., Holden J. L., und Murphy P. T. (1994) The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids* **29**, 509-516.
- Gattinger A., Günthner A., Schloter M., und Munch J. C. (2003) Characterisation of Archaea in soils by polar lipid analysis. *Acta Biotechnologica* **23**, 21-38.
- Gattinger A., Schloter M., und Munch J. C. (2002) Phospholipid etherlipid and phospholipid fatty acid fingerprinting in selected euryarchaeotal monocultures for taxonomic profiling. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**, 133-139.
- Gauthier G., Gauthier M., und Christen R. (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen., nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 755-761.
- Gauthier M. J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., und Bertrand J. C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 568-576.
- Gehling J. G. und Rigby J. K. (1996) Long expected sponges from the neoproterozoic Ediacara fauna of South Australia. *J. Paleont.* **70**, 185-195.
- Gerson T., Patel J. J., und Nixon L. N. (1974) Some unusual fatty acids of *Rhizobium*. *Lipids* **10**, 134-139.
- Gillan F. T. (1983) Analysis of complex fatty acid methyl ester mixtures on non-polar capillary GC columns. *J. Chromatogr. Sci.* **21**, 293-297.



- Gillan F. T. und Hogg R. W. (1984) A method for the estimation of bacterial biomass and community structure in mangrove-associated sediments. *Journal of Microbiological Methods* **2**, 275-293.
- Gillan F. T. und Johns R. B. (1980) Input and early diagenesis of chlorophylls in a temperate intertidal sediment. *Mar. Chem.* **9**, 243-253.
- Gillan F. T., Stoilov I. L., Thompson J. E., Hogg R. W., Wilkinson C. R., und Djerassi C. (1988) Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids* **23**, 1139-1145.
- Giner J.-L. (1993) Biosynthesis of marine sterol side-chains. *Chem. Rev.* **93**, 1735-1752.
- Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L., und Field K. G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63.
- Gliozzi A., Paoli G., De Rosa M., und Gambacorta A. (1983a) Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **735**, 234-242.
- Gliozzi A., Rolandi R., De Rosa M., und Gambacorta A. (1983b) Monolayer black membranes from bipolar lipids of archaeobacteria and their temperature-induced structural changes. *The Journal of Membrane Biology* **75**, 45-56.
- Gogarten J. P., Kibak H., Dittrich P., Taiz L., Bowman E. J., Bowman B. J., Manolson M. F., Poole R. J., Date T., Oshima T., Konishi J., Denda K., und Yoshida M. (1989) Evolution of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: Implications of the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6661-6665.
- Goldfine H. (1984) Bacterial membranes and lipid packing theory. *J. Lipid Res.* **25**, 1501-1507.
- Goldfine H. und Hagen P.-O. (1972) Bacterial plasmalogens. In *Ether lipids - Chemistry and biology* (ed. F. Snyder), Academic Press. New York. pp. 329-350
- Goldfine H. und Langworthy T. A. (1988) A growing interest in bacterial ether lipids. *TIBS* **13**, 217-221.
- Goossens H., Düren R. R., De Leeuw J. W., und Schenk P. A. (1989) Lipids and their mode of occurrence in bacteria and sediments - II. Lipids in the sediment of a stratified, freshwater lake. *Org. Geochem.* **14**, 27-41.
- Götz D., Banta A. B., Beveridge T. J., und Rushdi A. I. (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **52**, 1349-1359.
- Grabowski V. (2002) Nachweis und Charakterisierung von Actinobakterien und einigen Planctomycetales aus marinen Schwämmen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel. Kiel.
- Grasshoff K. (1983) *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie. Weinheim. pp.419
- Grebmeier J. M. und Barry J. P. (1991) The influence of oceanographic processes on pelagic-benthic coupling in polar regions: A benthic perspective. *Journal of Marine Systems* **2**, 495-518.
- Grogan D. W. und Cronan J. E. J. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 429-441.
- Gruber G. und Reitner J. (1991) Isolated poriferan micro- and megascleres from the lower Campanian of Höver (northern Germany) and remarks on the phylogeny of the taxon Geodiidae (Demospongiae). *Berliner Geowissenschaftliche Abhandlungen (A)* **134**, 107-117.
- Guckert J. B., Antworth C. P., Nichols P. D., und White D. C. (1985) Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**, 147-158.
- Guckert J. B., Hood M. A., und White D. C. (1986) Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 794-801.
- Guckert J. B., Ringelberg D. B., und White D. C. (1987) Biosynthesis of *trans* fatty acids from acetate in the bacterium *Pseudomonas atlantica*. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 748-754.
- Gunasekera S. P., Gunasekera M., und McCarthy P. (1991) Discodermide: A new bioactive macrocyclic lactam from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.* **56**, 4830-4833.
- Gupta R. S. und Bolding G. B. (1996) The origin of the eukaryotic cell. *TIBS* **21**, 166-171.
- Haack S. K., Garchow H., Odelson D. A., Forney L. J., und Klug M. J. (1994) Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2483-2493.

- Haflidason H., Aarseth I., Haugen J.-E., Sejrup H. P., Lövlie R., und Reither E. (1991) Quaternary stratigraphy of the Draugen area, Mid-Norwegian shelf. *Mar. Geol.* **101**, 125-146.
- Hahn S., Stoilov I. L., Tam Ha T. B., Raederstorff D., Doss G. A., Li H.-T., und Djerassi C. (1988) Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8117-8124.
- Hamamoto T., Takata N., Kudo T., und Horikoshi K. (1995) Characteristic presence of polyunsaturated fatty acids in marine psychrophilic vibrios. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 51-56.
- Han T.-M. und Runnegar B. (1992) Megascopic eukaryotic algae from the 2.1-billion-year-old neogaunee iron-formation, Michigan. *Science* **257**, 232-235.
- Hansen T. A. und Imhoff J. F. (1985) *Rhodobacter veldkampii*, a new species of phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 115-116.
- Harwood J. L. und Russell N. J. (1984) *Lipids in plants and microbes*. Allen & Unwin. London
- Hauser H., Hazlewood G. P., und Dawson R. M. C. (1979) Membrane fluidity of a fatty acid auxotroph grown with palmitic acid. *Nature* **279**, 536-538.
- Haygood M. G., Schmidt E. W., Davidson S. K., und Faulkner D. J. (1999) Microbial symbionts of marine invertebrates: Opportunities for microbial biotechnology. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 33-43.
- Hazlewood G. P., Clarke N. G., und Dawson R. M. C. (1980) Complex lipids of a lipolytic and general-fatty-acid-requiring *Butyrivibrio* sp. isolated from the ovine rumen. *Biochem. J.* **191**, 555-560.
- Hazlewood G. P. und Dawson A. G. (1979) Characteristics of a lipolytic and fatty acid-requiring *Butyrivibrio* sp. isolated from the ovine rumen. *J. Gen. Microbiol.* **112**, 15-27.
- Heipieper H.-J., Diefenbach R., und Keweloh H. (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1847-1852.
- Helmy F. M. und Hack M. H. (1986) Some contributions to thin-layer chromatographic analysis of complex natural phospholipid and neutral lipid mixtures. *J. Chromatogr.* **374**, 61-72.
- Henderson R. J., Millar R.-M., Sargent J. R., und Jostensen J. P. (1993) *Trans*-monoenoic and polyunsaturated fatty acids in phospholipids of a *Vibrio* species of bacterium in relation to growth conditions. *Lipids* **28**, 389-396.
- Hentschel U., Hopke J., Horn M., Friedrich A. B., Wagner M., Hacker J., und Moore B. S. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431-4440.
- Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C., und Hacker J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**, 305-312.
- Hermans M. A. F., Neuss B., und Sahn H. (1991) Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **179**, 5592-5595.
- Hernandez L. M. C., De la Fuente Blanco J. A., Baz J. P., Puentes J. L. F., Millan F. R., Vazquez F. E., Fernandez-Chimeno R. I., und Gravalos D. G. (2000) 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporin, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. strain. *Journal of Antibiotics* **53**, 895-902.
- Hershberger K. L., Barns S. M., Reysenbach A.-L., Dawson S. C., und Pace N. R. (1996) Wide diversity of crenarchaeota. *Nature* **384**, 420.
- Higgs M. D. und Faulkner D. J. (1978) Plakortin, an antibiotic from *Plakortis halichondrioides*. *J. Org. Chem.* **43**, 3454-3457.
- Hildebrandt H., Dornblüth O., und Psychrembel W. (2001) *Psychrembel - Klinisches Wörterbuch*. 258. Aufl., CD-ROM V. 2
- Hinrichs K.-U. (2001) A molecular recorder of methane hydrate destabilization. *Geochem. Geophys. Geosyst.* **2**.
- Hinrichs K.-U., Hayes J. M., Sylva S. P., Brewer P. G., und DeLong E. F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**, 802-805.

## Literatur

---

- Hinrichs K.-U., Summons R. E., Orphan V. J., Sylva S. P., und Hayes J. M. (2000) Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Org. Geochem.* **31**, 1685-1701.
- Hirota H., Tomono Y., und Fusetani N. (1996) Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron* **52**, 2359-2368.
- Hoefs M. J. L., Schouten S., De Leeuw J. W., King L. L., Wakeham S. G., und Sinninghe Damsté J. S. (1997) Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3090-3095.
- Hoffmann F. (2003) Microbial sulfate reduction in the tissue of the cold-water sponge *Geodia barretti* (Tetractinellida, Demospongiae). Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen. Göttingen.
- Höld I. M., Schouten S., Jellema J., und Sinninghe Damsté J. S. (1999) Origin of free and bound mid-chain methyl alkanes in oils, bitumens and kerogens of the marine, Infracambrian Huqf Formation (Oman). *Org. Geochem.* **30**, 1411-1428.
- Holloway P. J. (1972) The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* Roth. *Chem. Phys. Lipids* **9**, 158-170.
- Holmström C. und Kjelleberg S. (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**, 285-293.
- Holzer G., Oró J., und Tornabene T. G. (1979) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of neutral lipids from methanogenic and thermoacidophilic bacteria. *J. Chromatogr.* **186**, 795-809.
- Hooper J. N. A. (2000) 'Sponguide'. Guide to sponge collection and identification. <http://www.qmuseum.qld.gov.au/organisation/sections/SessileMarineInvertebrates/index.asp> Version August 2000.
- Hooper J. N. A. und van Soest R. W. M. (2002) Systema Porifera - a guide to the classification of sponges, pp. 1810. Kluwer Academic.
- Hough D. W. und Danson M. J. (1999) Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**, 39-45.
- Hovland M., Mortensen P. B., Brattegard T., Strass P., und Rokoengen K. (1998) Ahermatypic coral banks off Mid-Norway: evidence for a link with seepage of light hydrocarbons. *Palaios* **13**, 189-200.
- Hovland M. und Thomsen E. (1997) Cold-water corals - are they hydrocarbon seep related? *Mar. Geol.* **137**, 159-164.
- Huber H., Hohn M. J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V. C., und Stetter K. O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63 - 67.
- Huber R., Langworthy T. A., König H., Thomm M., Woese C. R., Sleytr U. B., und Stetter K. O. (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch. Microbiol.* **144**, 324-333.
- Huber R., Rossnagel P., Woese C. R., Rachel R., Langworthy D. E., und Stetter K. O. (1996) Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen. nov. sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**, 40-49.
- Huber R., Wilharm T., Huber D., Trincone A., Burggraf S., König H., Rachel R., Rockinger I., Fricke H., und Stetter K. O. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 340-351.
- Huu N. B., Denner E. B. M., Ha D. T. C., Wanner G., und Stan-Lotter H. (1999) *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 367-375.
- Ikemoto S., Suzuki K., Kaneko T., und Komagata K. (1980) Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* which do not require methionine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 437-447.
- Illanes A. (1999) Stability of biocatalysts. *Electr. J. Biotechnol.* **2**, 7-15.
- Imamura N., Nishijima M., Adachi K., und Sano H. (1993) Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *Journal of Antibiotics* **46**, 241-246.
- Imhoff J. F. und Trüper H. G. (1976) Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic bacteria. *Microb. Ecol.* **3**, 1-9.
- Innes H. E., Bishop A. N., Head I. M., und Farrimond P. (1997) Preservation and diagenesis of hopanoids in recent lacustrine sediments of Priest Pot, England. *Org. Geochem.* **26**, 565-576.

- Isay S. V., Makarchenko M. A., and Vaskovsky V. E. (1976) A study of glyceryl ethers I. Content of alpha-glyceryl ethers in marine invertebrates from the Sea of Japan and tropical regions of the Pacific Ocean. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative biochemistry* **55**, 301-305.
- Itoh Y. H., Sugai A., Uda I., and Itoh T. (2001) The evolution of lipids. *Advances in Space Research* **28**, 719-724.
- Ivanova E. P., Kiprianova E. A., Mikhailov V. V., Levanova G. F., Garagulya A. D., Gorshkova N. M., Vysotskii M. V., Nicolau D. V., Yumoto N., Taguchi T., and Yoshikawa S. (1998a) Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 247-256.
- Ivanova E. P., Nicolau D. V., Yumoto N., Taguchi T., Okamoto K., Tatsu Y., and Yoshikawa S. (1998b) Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Mar. Biol.* **130**, 545-551.
- Ivanova E. P., Shevchenko L. S., Sawabe T., Lysenko A. M., Svetashev V. I., Gorshkova N. M., Satomi M., Christen R., and Mikhailov V. V. (2002) *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **52**, 263-271.
- Ivanova E. P., Zhukova N. V., Svetashev V. I., Gorshkova N. M., Kurilenko V. V., Frolova G. M., and Mikhailov V. V. (2000) Evaluation of phospholipid and fatty acid composition as chemotaxonomic markers of *Alteromonas*-like proteobacteria. *Curr. Microbiol.* **41**, 341-345.
- Iwabe N., Kuma K.-I., Hasegawa M., Osawa S., and Miyata T. (1989) Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9355-9359.
- Jaffé R., Albrecht P., and Oudin J.-L. (1987) Carboxylic acids as indicators of oil migration - I. Occurrence and geochemical significance of C-22 diastereoisomers for the (17 $\beta$ H,21 $\beta$ H) C<sub>30</sub> hopanoic acid in geological samples. *Org. Geochem.* **13**, 483-488.
- Jahnke L. L., Eder W., Huber R., Hope J. M., Hinrichs K.-U., Hayes J. M., Des Marais D. J., Cady S. L., and Summons R. E. (2001) Signature lipids and stable carbon isotope analyses of Octopus Spring hyperthermophilic communities compared with those of *Aquificales* representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5179-5189.
- Jahnke L. L., Summons R. E., Dowling L. M., and Zahiralis K. D. (1995) Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: chemical and isotopic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 576-582.
- Jahnke L. L., Summons R. E., Hope J. M., and Des Marais D. J. (1999) Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria II: The effects of physiology and environmental parameters on the biosynthesis and isotopic signatures of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 79-93.
- Jayatilake G. S., Thornton M. P., Leonard A. C., Grimwade J. E., and Baker B. J. (1996) Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* **59**, 293-296.
- Jefferts E., Morales R. W., and Litchfield C. (1974) Occurrence of *cis*-5,*cis*-9-hexacosadienoic and *cis*-5,*cis*-9,*cis*-19-hexacosatrienoic acids in the marine sponge *Microcionia prolifera*. *Lipids* **9**, 244-247.
- Jensen A. and Frederiksen R. (1992) The fauna associated with the bank-forming deepwater coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) on the Faroe shelf. *Sarsia* **77**, 53-69.
- Jensen P. R. and Fenical W. (1994) Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annual Review in Microbiology* **48**, 559-584.
- Johnson K. M., King A. E., and Sieburth J. M. (1985) Coulometric TCO<sub>2</sub> analyses for marine studies; an introduction. *Mar. Chem.* **16**, 61-82.
- Johnson K. M. and Sieburth J. M. (1987) Coulometric total carbon dioxide analysis for marine studies: automation and calibration. *Mar. Chem.* **21**, 117-133.
- Johnson K. M., Wills K. D., Butler D. B., Johnson W. K., and Wong C. S. (1993) Coulometric total carbon dioxide analysis for marine studies: maximizing the performance of an automated gas extraction system and coulometric detector. *Mar. Chem.* **44**, 167-187.
- Jones W. J., Nagle D. G., and Whitman W. B. (1987) Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* **51**, 135-177.

- Julák J., Turecek F., und Miková Z. (1980) Identification of characteristic branched-chain fatty acids of *Mycobacterium kansasii* and *gordonae* by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **190**, 183-187.
- Jung S. und Hollingsworth R. I. (1994) Structures and stereochemistry of the very long  $\alpha,\omega$ -bifunctional alkyl species in the membrane of *Sarcina ventriculi* indicate that they are formed by tail-to-tail coupling of normal fatty acids. *J. Lipid Res.* **35**, 1932-1945.
- Jung S., Lowe S. E., Hollingsworth R. I., und Zeikus J. G. (1993) *Sarcina ventriculi* synthesizes very long chain dicarboxylic acids in response to different forms of environmental stress. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 2828-2835.
- Jung S., Zeikus J. G., und Hollingsworth R. I. (1994) A new family of very long chain  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acids is a major structural fatty acyl component of the membrane lipids of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *J. Lipid Res.* **35**, 1057-1065.
- Kamio Y., Kanegasaki S., und Takahashi H. (1969) Occurrence of plasmalogens in anaerobic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**, 439-451.
- Kandler O. und König H. (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 305-308.
- Kaneda T. (1972) Positional preference of fatty acids in phospholipids of *Bacillus cereus* and its relation to growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **280**, 297-305.
- Kaneda T. (1977) Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews* **41**, 391-418.
- Kaneda T. (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**, 288-302.
- Kaneshiro E. S. (1987) Lipids of *Paramecium*. *J. Lipid Res.* **28**, 1241-1258.
- Kannenberg E., Poralla K., und Blume A. (1980) A hopanoid from the thermo-acidophilic *Bacillus acidocaldarius* condenses membranes. *Naturwissenschaften* **67**, 458-459.
- Kannenberg E. L., Perzl M., und Härtner T. (1995) The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 255-262.
- Kannenberg E. L. und Poralla K. (1999) Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**, 168-176.
- Karlsen D. A., Nyland B., Flood B., Ohm S. E., Brekke T., Olsen S., und Backer-Owe K. (1995) Petroleum geochemistry of the Haltenbanken, Norwegian continental shelf. *Geological Society Special Publication* **86**, 203-256.
- Karner M. B., DeLong E. F., und Karl D. M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**, 507 - 510.
- Kass L. R. und Bloch K. (1967) On the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1168-1173.
- Kates M. (1996) Structural analysis of phospholipids and glycolipids in extremely halophilic archaeobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **25**, 113-128.
- Kelley C. A. und Jeffrey W. H. (2002) Dissolved methane concentration profiles and air-sea fluxes from 41°S to 27°N. *Global Biogeochem. Cycles* **16**, 13/1-13/6.
- Kerr R. G. und Baker B. (1991) Marine sterols. *Nat. Prod. Rep.* **8**, 465-497.
- Keweloh H. und Heipieper H.-J. (1996) *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, 129-137.
- Kieft T. L., Ringelberg D. B., und White D. C. (1994) Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3292-3299.
- King L. L., Pease T. K., und Wakeham S. G. (1998) Archaea in Black Sea water column particulate matter and sediments - evidence from ether lipid derivatives. *Org. Geochem.* **28**, 677-688.
- Kirchman D. L., Yu L., Fuchs B. M., und Amann R. (2001) Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**, 13-22.

- Klein R. A., Hazlewood G. P., Kemp P., und Dawson R. M. C. (1979) A new series of long-chain dicarboxylic acids with vicinal dimethyl branching found as major components of the lipids of *Butyrivibrio* spp. *Biochem. J.* **183**, 691-700.
- Kobayashi J. und Ishibashi M. (1993) Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* **93**, 1753-1769.
- Kobayashi M. und Kitagawa I. (1998) Likely microbial participation in the production of bioactive marine sponge chemical constituents. In *Sponge Sciences - Multidisciplinary Perspectives* (ed. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 379-389
- Kobayashi M. und Satoh N. (1998) Molecular evidence for early evolution of metazoa. In *Sponge sciences - multidisciplinary perspectives* (ed. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 157-163
- Koblížek M., Bějá O., Bidigare R. R., Christensen S., Benitez-Nelson B., Vetriani C., Kolber M. K., Falkowski P. G., und Kolber Z. S. (2003) Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Arch. Microbiol.* **180**, 327-338.
- Koga Y., Akagawa-Matsushita M., Ohga M., und Nishihara M. (1993a) Taxonomic significance of the distribution of component parts of polar ether lipids in methanogens. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 342-351.
- Koga Y., Morii H., Akagawa-Matsushita M., und Ohga M. (1998) Correlation of polar lipid composition with 16S rRNA phylogeny in methanogens. Further analysis of lipid component parts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 230-236.
- Koga Y., Nishihara M., Morii H., und Akagawa-Matsushita M. (1993b) Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiol. Rev.* **57**, 164-182.
- Kohnen M. E. L., Schouten S., Sinninghe Damsté J. S., De Leeuw J. W., Merritt D. A., und Hayes J. M. (1992) Recognition of paleobiochemicals by a combined molecular sulfur and isotope geochemical approach. *Science* **256**, 358-362.
- Kohring L. L., Ringelberg D. B., Devereux R., Stahl D. A., Mittelman M. W., und White D. C. (1994) Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 303-308.
- Kolattukudy P. E., Kronman K., und Poulouse A. J. (1975) Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiology* **55**, 567-573.
- Kornprobst J.-M. und Barnathan G. (1998) Methoxy fatty acids in nature. *Recent Research Developments in Lipids Research* **2**, 371-380.
- Krauss J. H., Seydel U., Weckesser J., und Mayer H. (1989) Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. *Eur. J. Biochem.* **180**, 519-526.
- Kruse M., Leys S. P., Müller I. M., und Müller W. E. G. (1998) Phylogenetic position of the Hexactinellida within the phylum Porifera based on the amino acid sequence of the protein kinase C from *Rhabdocalypus dawsoni*. *J. Mol. Evol.* **46**, 721-728.
- Kuypers M. M. M., Blokker P., Erbacher J., Kinkel H., Pancost R. D., Schouten S., und Sinninghe Damsté J. S. (2001) Massive expansion of marine archaea during a mid-Cretaceous oceanic anoxic event. *Science* **293**, 92 - 94.
- Kuypers M. M. M., Blokker P., Hopmans E. C., Kinkel H., Pancost R. D., Schouten S., und Sinninghe Damsté J. S. (2002) Archaeal remains dominate marine organic matter from the early Albian oceanic anoxic event 1b. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **185**, 211-234.
- Ladage S., Seifert R., Michaelis W., Rupp H., Halbach P., und Makris J. (1991) Hydrothermal gas generation in a back-arc basin. *Naturwissenschaften* **78**, 64-66.
- Lafay B., Ruimy R., Rausch de Traubenberg C., Breitmayer V., Gauthier M. J., und Christen R. (1995) *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 290-296.
- Lam W.-K., Beatty M. F., Hahn S., und Djerassi C. (1991) Metabolism of unusual membrane phospholipids in the marine sponge *Microciona prolifera*. *Biochemistry* **30**, 372-377.

- Lam W.-K., Hahn S., Ayanoglu E., und Djerassi C. (1989) Phospholipid studies of marine organisms. 22. Structure and biosynthesis of a novel brominated fatty acid from a Hymeniacidonid sponge. *J. Org. Chem.* **54**, 3428-3432.
- Langworthy T. A. (1982) Lipids of bacteria living in extreme environments. *Current topics in membranes and transport* **17**, 45-77.
- Langworthy T. A. (1985) Lipids of Archaeobacteria. In *The bacteria. A treatise on structure and function*, Vol. VIII (ed. C. R. Woese und R. S. Wolfe), Academic Press. New York. pp. 459-497
- Langworthy T. A., Holzer G., Zeikus J. G., und Tornabene T. G. (1983) Iso- and anteiso-branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 1-17.
- Langworthy T. A. und Mayberry W. R. (1976) A 1,2,3,4-tetrahydroxypentane substituted pentacyclic triterpene from *Bacillus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, 550-577.
- Langworthy T. A. und Pond J. L. (1986a) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **7**, 253-257.
- Langworthy T. A. und Pond J. L. (1986b) Membranes and lipids of thermophiles. In *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology* (ed. T. D. Brock), Wiley. New York. pp. 107-135
- Lankelma J., Ayanoglu E., und Djerassi C. (1983) Double-bond location in long chain polyunsaturated fatty acids by chemical Ionization-mass spectrometry. *Lipids* **18**, 853-858.
- Larsson L., Maardh P.-A., Odham G., und Westerdahl G. (1980) Detection of tuberculostearic acid in biological specimens by means of glass capillary gas chromatography-electron and chemical ionization mass spectrometry, utilizing selected ion monitoring. *J. Chromatogr.* **182**, 402-408.
- Lattuati A., Guezennec J., Metzger P., und Largeau C. (1998) Lipids of *Thermococcus hydrothermalis*, an archaea isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Lipids* **33**, 319-326.
- Lawson M. P., Bergquist P. R., und Cambie R. C. (1984) Fatty acid composition and the classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**, 375-393.
- Lawson M. P., Thompson J. E., und Djerassi C. (1988) Cell membrane localization of long chain C<sub>24</sub>-C<sub>30</sub> fatty acids in two marine demosponges. *Lipids* **23**, 741-749.
- Lechevalier H. und Lechevalier M. P. (1988) Chemotaxonomic use of lipids - an overview. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 869- 902
- Lechevalier M. P. (1977) Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *Critical reviews in microbiology* **5**, 109-210.
- Lee S. D., Kang S.-O., und Hah Y. C. (2000) *Hongia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **50**, 191-199.
- Lee T.-C. (1998) Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 129-145.
- Lehmann und Hillmer G. (1997) *Wirbellose Tiere der Vorzeit - Leitfaden der systematischen Paläontologie der Invertebraten*. Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart. pp.320
- Lévi C. und Lévi P. (1976) Embryogenèse de *Chondrosia reniformis* (Nardo), demosponge ovipare, et transmission des bactéries symbiotiques. *Annales des Sciences Naturelles (Zoologie)* **18**, 367-380.
- Li C.-W., Chen J.-Y., und Hua T.-E. (1998) Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**, 879-306.
- Lianos E. A. und Zanglis A. (1987) Biosynthesis and metabolism of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in rat glomerular mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 8990-8993.
- Libes S. (1992) *An introduction to marine biogeochemistry*. John Wiley & sons. New York. pp.734
- Liefkens W., Boon J. J., und De Leeuw J. W. (1979) On the occurrence of alkyl- and alk-1-enyl-diacylglycerides in the lugworm *Arenicola marina*. *Netherlands Journal of Sea Research* **13**, 479-486.
- Lien R. (1983) Pløyemerker etter isfjell på norsk kontinentalsokkel, pp. 1-147. Institutt for Kontinentalsokkelundersøkelser.
- Lindel T. (1998) Marine Naturstoffe am Great Barrier Reef. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **46**, 1175-1177.

## Literatur

---

- Lipski A., Spieck E., Makolla A., und Altendorf K. (2001) Fatty acid profiles of nitrite-oxidizing bacteria reflect their phylogenetic heterogeneity. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 377-384.
- Litchfield C., Greenberg A. J., Noto G., und Morales R. W. (1976) Unusually high levels of C<sub>24</sub>-C<sub>30</sub> fatty acids in sponges of the class demospongiae. *Lipids* **11**, 567-571.
- Litchfield C. und Marcantonio E. E. (1978) Occurrence of 5,9,19-octacosatrienoic, 5,9-hexacosadienoic and 17-hexacosenoic acids in the marine sponge *Xestospongia halichondroides*. *Lipids* **13**, 199-202.
- Litchfield C. und Morales R. W. (1976) Are demospongiae membranes unique among living organisms? In *Aspects of sponge biology* (ed. F. W. Harrison und R. R. Cowden), Academic Press. New York. pp. 183-200
- Litchfield C., Tyszkiewicz J., und Dato V. (1980) 5,9,23-Triacontatrienoic acid, principal fatty acid of the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids* **15**, 200-202.
- Ljøen R. und Nakken O. (1969) On the hydrography of the shelf waters off Møre and Helgeland. *Fiskeri Direktoratets Skrifter, Serie Hav Undersøkelse* **15**, 285-294.
- Llopiz P., Jürgens U. J., und Rohmer M. (1996) Prokaryotic triterpenoids: Bacteriohopanetetrol glycuronosides from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6907. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**, 199-202.
- Long B. H. und Coe E. L. (1976) Fatty acid composition of lipid fractions from vegetative cells and mature sorocarps of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Lipids* **12**, 414-417.
- Long D., Smith D. E., und Dawson A. G. (1989) A Holocene tsunami deposit in eastern Scotland. *Journal of Quaternary Science* **4**, 61-66.
- Lopez J. V., McCarthy P. J., Janda K. E., Willoughby R., und Pomponi S. A. (1999) Molecular techniques reveal wide phyletic diversity of heterotrophic microbes associated with *Discodermia* spp. (Porifera: Demospongia). *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 329-341.
- Lösel D. M. (1988) Fungal lipids. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 699-806
- Lovejoy C., Bowman J. P., und Hallgraeff G. M. (1998) Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2806-2813.
- Lu H., Peng P., und Sun Y. (2003) Molecular and stable carbon isotopic composition of monomethylalkanes from one oil sand sample: source implications. *Org. Geochem.* **34**, 745-754.
- Luquin M., Ausina V., López Calahorra F., Belda F., García Barceló M., Celma C., und Prats G. (1991) Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 120-130.
- Mackie G. O. und Singla C. A. (1983) Studies on Hexactinellida. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe 1873). *Proc. R. Soc. Lond. B* **301**, 365-400.
- MacPherson J. C., Pavlovich J. G., und Jacobs R. S. (1998) Phospholipid composition of the granular amebocyte from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Lipids* **33**, 931-940.
- Madigan M. T., Martinko J. M., und Parker J. (1997) *Brock Biology of microorganisms*. Prentice Hall International, Inc. pp.986
- Madrigal R. V. und Smith Jr. C. R. V. (1975) *Taxus baccata* seed oil: a new source of *cis*-5,*cis*-9-octadecadienoic acid. *Lipids* **10**, 502-504.
- Malins D. C. und Varanasi U. (1972) The ether bond in marine lipids. In *Ether lipids - Chemistry and biology* (ed. F. Snyder), Academic Press. New York. pp. 297-312
- Mangold H. K. (1972) Biological effects and biomedical applications of alkoxylipids. In *Ether lipids - Chemistry and biology* (ed. F. Snyder), Academic Press. New York. pp. 157-175
- Mangold H. K. und Weber N. (1987) Biosynthesis and biotransformation of ether lipids. *Lipids* **22**, 789-799.
- Manz W., Arp G., Schumann-Kindel G., Szewzyk U., und Reitner J. (2000) Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *Journal of Microbiological Methods* **40**, 125-134.
- Margot H., Acebal C., Toril E., Amils R., und Fernandez Puentes J. L. (2002) Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.* **140**, 739-745.



- Margulis L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1071-1076.
- Martin J. H. und Fitzwater S. E. (1992) Dissolved organic carbon in the Atlantic, Southern and Pacific oceans. *Nature* **356**, 399-700.
- Martin W. und Müller M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37-41.
- Massana R., Murray A. E., Preston C. M., und DeLong E. F. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 50-56.
- Matsunaga S., Nogata Y., und Fusetani N. (1998) Thiomycalolides: New cytotoxic trisoxazole-containing macrolides isolates from a marine sponge *Mycale* sp. *J. Nat. Prod.* **61**, 663-666.
- McCaffrey M. A., Moldowan J. M., Lipton P. A., Summons R. E., Peters K. E., Jeganathan A., und Watt D. S. (1994) Paleoenvironmental implications of novel C<sub>30</sub> steranes in Precambrian to Cenozoic age petroleum and bitumen. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 529-532.
- McClintock J. B. und Baker B. J. (1997) A review of the chemical ecology of Antarctic marine invertebrates. *Amer. Zool.* **37**, 329-342.
- McCloskey J. A. und Law J. H. (1967) Ring location in cyclopropane fatty acid esters by a mass spectrometric method. *Lipids* **2**, 225 - 230.
- McInerney J. O., Wilkinson M., Patching J. W., Embley T. M., und Powell R. (1995) Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1646-1648.
- Meredith W., Kelland S.-J., und Jones D. M. (2000) Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition. *Org. Geochem.* **31**, 1059-1073.
- Meyer-Reil L.-A. (1993) Mikrobielle Besiedlung und Produktion. In *Mikrobiologie des Meeresbodens* (ed. L.-A. Meyer-Reil und M. Köster), Gustav Fischer Verlag. Jena. pp. 38-81
- Michaelis W. und Albrecht P. (1979) Molecular fossils of archaeobacteria in kerogen. *Naturwissenschaften* **66**, 420-422.
- Michaelis W., Jenisch A., Richnow H. H., Kruse U., und Mycke B. (1988) Organofazies des Ölschiefers von Messel. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* **107**, 79-87.
- Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel V., Blumenberg M., Knittel K., Gieseke A., Peterknecht K., Pape T., Boetius A., Amann R., Jørgensen B. B., Widdel F., Peckmann J., Pimenov N. V., und Gulín M. B. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**, 1013-1015.
- Moldowan J. M. und Seifert W. K. (1979) Head-to-head linked isoprenoid hydrocarbons in petroleum. *Science* **204**, 169-171.
- Moore B. S. (1999) Biosynthesis of marine natural products: Microorganisms and macroalgae. *Natural Products Report* **16**, 653-674.
- Moore B. S., Trischman J. A., Seng D., Kho D., Jensen P. R., und Fenical W. (1999) Salinamides, antiinflammatory depsipeptides from a marine Streptomyces. *J. Org. Chem.* **64**, 1145-1150.
- Morales R. W. und Litchfield C. (1976) Unusual C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub> and C<sub>27</sub> polyunsaturated fatty acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, 206-216.
- Moreau R. A., Agnew J., Hicks K. B., und Powell M. J. (1997) Modulation of lipoxygenase activity by bacterial hopanoids. *J. Nat. Prod.* **60**, 397-398.
- Moreira D. und López-García P. (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and  $\delta$ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J. Mol. Evol.* **47**, 517-530.
- Mork M. (1981) Circulation phenomena and frontal dynamics of the Norwegian coastal current. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* **302**, 635-647.
- Mortensen P. B., Hovland M., Brattegard T., und Farestveit R. (1995) Deep water bioherms of the scleractinian coral *Lophelia pertusa* (L.) at 64° N on the Norwegian shelf: structure and associated megafauna. *Sarsia* **80**, 145-158.

## Literatur

---

- Mortensen P. B., Hovland M., Fossaa J. H., und Furevik D. M. (2001) Distribution, abundance and size of *Lophelia pertusa* coral reefs in mid-Norway in relation to seabed characteristics. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **81**, 581-597.
- Moss C. W., Holzer G., Wallace P. L., und Hollis D. G. (1990) Cellular fatty acid compositions of an unidentified organism and a bacterium associated with cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1071-1074.
- Müller W. E. G. (1997) Evolution of Protozoa to Metazoa. *Theory in Biosciences* **116**, 145-168.
- Müller W. E. G., Böhm M., Batel R., De Rosa S., Tommonaro G., Müller I. M., und Schröder H. C. (2000) Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of Avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1077-1081.
- Müller W. E. G. und Müller I. M. (1999) Origin of the Metazoa: A review of molecular biological studies with sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 381-397.
- Mycke B., Narjes F., und Michaelis W. (1987) Bacteriohopanetetrol from chemical degradation of an oil shale kerogen. *Nature* **326**, 179-181.
- Myers B. L. und Crews P. (1983) Chiral ether glycerides from a marine sponge. *J. Org. Chem.* **48**, 3583-3585.
- Myher J. J., Marai L., und Kuksis A. (1974) Identification of monoacyl- and monoalkylglycerols by gas-liquid chromatography-mass spectrometry using polar siloxane liquid phases. *J. Lipid Res.* **15**, 586-592.
- Nagumo A., Ishida F., Kamei T., und Suzuki Y. (1992) Effect of bacteriohopane-32-ol on lipid metabolism in Hep G2 Cells. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1332-1334.
- Naraoka H., Yamada K., und Ishiwatari R. (2000) Recent sedimentary hopanoids in the northwestern Pacific alongside the Japanese Island - their concentrations and carbon isotopic compositions. *Org. Geochem.* **31**, 1023-1029.
- Nechev J., Christie W. W., Robaina R., de Diego F. M., Ivanova A., Popov S., und Stefanov K. (2002) Chemical composition of the sponge *Chondrosia reniformis* from the Canary Island. *Hydrobiologia* **489**, 91-98.
- Neunlist S., Rodier C., und Llopiz P. (2002) Isotopic biogeochemistry of the lipids in recent sediments of Lake Bled (Slovenia) and Baldeggersee (Switzerland). *Org. Geochem.* **33**, 1183-1195.
- Neunlist S. und Rohmer M. (1985a) A novel hopanoid, 30-(5'-adenosyl)hopan, from the purple non-sulphur bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*, with possible DNA interactions. *Biochem. J.* **228**, 769-771.
- Neunlist S. und Rohmer M. (1985b) Novel hopanoids from the methylotrophic bacteria *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas methanica*. *Biochem. J.* **231**, 635-639.
- Nichols D. S. (2003) Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 1-7.
- Nichols D. S., McMeekin T. A., und Nichols P. D. (1994) Manipulation of polyunsaturated, branched-chain and *trans*-fatty acid production in *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. *Microbiology* **140**, 577-584.
- Nichols D. S., Nichols P. D., Russell N. J., Davies N. W., und McMeekin T. A. (1997) Polyunsaturated fatty acids in the psychrophilic bacterium *Shewanella gelidimarina* ACAM 456<sup>T</sup>: molecular species analysis of major phospholipids and biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1347**, 164-176.
- Nichols D. S., Olley J., Garda H., Brenner R. R., und McMeekin T. A. (2000) Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2422-2429.
- Nichols P. D., Klumpp D. W., und Johns R. B. (1982) Lipid components of the seagrasses *Posidonia australis* and *Heterozostera tasmanica* as indicators of carbon source. *Phytochemistry* **21**, 1613-1621.
- Nichols P. D., Mancuso C. A., und White D. C. (1987) Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model systems. *Org. Geochem.* **11**, 451-461.
- Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., und Antranikian G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biot.* **51**, 711-729.

- Niepel T. (1999) Chemotaxonomie ausgewählter Gram-positiver Bakterien anhand ihrer polaren Lipide, Sequenzierung ihrer 16S rDNAs und Vergleich beider Methoden. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig. Braunschweig.
- Niepel T., Meyer H., Wray V., und Abraham W.-R. (1998) Intraspecific variation of unusual phospholipids from *Corynebacterium* spp. containing a novel fatty acid. *J. Bacteriol.* **180**, 4650-4657.
- Nishihara M., Morii H., und Koga Y. (1989) Heptads of polar ether lipids of an archaeobacterium, *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure and biosynthetic relationship. *Biochemistry* **28**, 95-102.
- Nishihara M., Utagawa M., Akutsu H., und Koga Y. (1992) Archaea contain a novel diether phosphoglycolipid with a polar head group identical to the conserved core of eucaryal glycosyl phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* **267**, 12432-12435.
- Oclarit J. M., Okada H., Ohta S., Kaminura K., Yamaoka Y., Iizuka T., Miyashiro S., und Ikegami S. (1994) Anti-Bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios* **78**, 7-16.
- Oclarit J. M., Yamaoka Y., Kamimura K., Ohta S., und Ikegami S. (1998) Andrimid, an antimicrobial substance in the marine sponge *Hyatella*, produced by an associated *Vibrio* bacterium. In *Sponge Sciences - Multidisciplinary Perspectives* (ed. Y. Watanabe und N. Fusetani), Springer-Verlag. Tokyo. pp. 391-398
- Ohtsubo S., Kanno M., Miyahara H., Kohno S., Koga Y., und Miura I. (1993) A sensitive method for quantification of acetoclastic methanogens and estimation of total methanogenic cells in natural environments based on an analysis of ether-linked glycerolipids. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**, 39-50.
- Okuyama H., Itoh H., Fukunaga N., und Sasaki S. (1984) Separation and properties of the inner and outer membranes of a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Plant and Cell Physiology* **25**, 1255-1264.
- Okuyama H., Okajima N., Sasaki S., Higashi S., und Murata N. (1991) The *cis* / *trans* isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, 13-20.
- O'Leary W. M. und Wilkinson S. B. (1988) Gram-positive bacteria. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 117-201
- Orgambide G. G., Huang Z.-H., Gage D. A., und Dazzo F. B. (1993) Phospholipid and fatty acid compositions of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 in relation to flavone-activated pSym nod gene expression. *Lipids* **28**, 975-979.
- Orphan V. J., Hinrichs K.-U., Ussler III W., Paull C. K., Taylor L. T., Sylva S. P., Hayes J. M., und DeLong E. F. (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1922-1934.
- Oschmann W. (1990) Dropstones - rocky mini-islands in high-latitude pelagic soft substrate environments. *Senckenbergiana Maritima* **21**, 55-75.
- Ourisson G. (1986) Vom Erdöl zur Evolution der Biomembranen. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **34**, 8-14.
- Ourisson G. (1987) Bigger and better hopanoids. *Nature* **326**, 126-127.
- Ourisson G. und Albrecht P. (1992) Hopanoids. 1. Geohopanoids: the most abundant natural products on earth? *Acc. Chem. Res.* **25**, 398-402.
- Ourisson G., Albrecht P., und Rohmer M. (1979) The hopanoids. Palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products. *Pure Appl. Chem.* **51**, 709-729.
- Ourisson G. und Rohmer M. (1992) Hopanoids. 2. Biohopanoids: a novel class of bacterial lipids. *Acc. Chem. Res.* **25**, 403-408.
- Paltauf F. (1994) Ether lipids in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids* **74**, 101-139.
- Pancost R. D., Bouloubassi I., Aloisi G., Sinninghe Damsté J. S., und Party t. M. S. (2001a) Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Org. Geochem.* **32**, 695-707.
- Pancost R. D., Hopmans E. C., Sinninghe Damsté J. S., und party T. M. s. s. (2001b) Archaeal lipids in Mediterranean cold seeps: Molecular proxies for anaerobic methane oxidation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 1611-1627.

- Pancost R. D., Sinninghe Damsté J. S., De Lint S., Van der Maarel M. J. E. C., Gottschal J. C., und party t. m. s. s. (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1126-1132.
- Pape T., Blumenberg M., Thiel V., und Michaelis W. (2004) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. *Bollettino dei Musei e degli Istituti biologici dell'Università di Genova* **accepted**.
- Parkes R. J., Dowling N. J. E., White D. C., Herbert R. A., und Gibson G. R. (1993) Characterization of sulphate-reducing bacterial populations within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 235-250.
- Parkes R. J. und Taylor A. (1983) The relationship between fatty acid distribution and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **16**, 173-189.
- Patt T. E. und Hanson R. S. (1978) Intracytoplasmic membrane, phospholipid, and sterol content of *Methylobacterium organophilum* cells grown under different conditions. *J. Bacteriol.* **134**, 636-644.
- Pawlik J. R. (1993) Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* **93**, 1911-1922.
- Perovic S., Wichels A., Schütt C., Gerds G., Pahler S., Steffen R., und Müller W. E. G. (1998) Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **6**, 125-133.
- Perry G. J., Volkman J. K., Johns R. B., und Bavor Jr. H. J. (1979) Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **43**, 1715-1725.
- Perry N. B., Becker E. G., Blunt J. W., Lake R. J., und Munro M. H. G. (1990) Diyne enol ethers of glycerol from a New Zealand sponge, *Petrosia hebes*. *J. Nat. Prod.* **53**, 732-734.
- Perry N. B., Ettouati L., Litaudon M., Blunt J. W., Munro M. H. G., Parkin S., und Hope H. (1994) Alkaloids from the antarctic sponge *Kirkpatrickia varialosa*. Part I: Variolin B, a new antitumor and antiviral compound. *Tetrahedron* **50**, 3987-3992.
- Peters K. E. und Moldowan J. M. (1991) Effects of source, thermal maturity, and biodegradation on the distribution and isomerization of homohopanes in petroleum. *Org. Geochem.* **17**, 47-61.
- Peters K. E. und Moldowan J. M. (1993) The Biomarker Guide - Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments., pp. 363. Prentice Hall.
- Pettit G. R. und Fujii Y. (1982) Antineoplastic agents. 81. The glycerol ethers of *Palythoa liscia*. *J. Nat. Prod.* **45**, 640-643.
- Polacheck J. W., Tropp B. E., und Law J. H. (1966) Biosynthesis of cyclopropane compounds - VIII. The conversion of oleate to dihydrosterulate. *J. Biol. Chem.* **241**, 3362 - 3364.
- Pond J. L., Langworthy T. A., und Holzer G. (1986) Long-chain diols: a new class of membrane lipids from a thermophilic bacterium. *Science* **231**, 1134-1136.
- Poralla K., Muth G., und Härtner T. (2000) Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 93-95.
- Pospíšil S. und Rezanka T. (1994) Changes in fatty acid branching and unsaturation of *Streptomyces cinnamonensis* as a response to NaCl concentration. *Folia Microbiologica* **39**, 187-190.
- Preston C. M., Wu K. Y., Molinski T. F., und DeLong E. F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbosium* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6241-6246.
- Prinsep M. R., Blunt J. W., und Munro M. H. G. (1989) A new sterol sulfate from the marine sponge *Stylopus australis*. *J. Nat. Prod.* **52**, 657-659.
- Privett O., Dougherty K. A., Erdahl W. L., und Stolyhwo A. (1973) Studies on the lipid composition of developing soybeans. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **50**, 516-520.
- Proksch P. (1991) Biologisch aktive Naturstoffe in marinen Invertebraten. *Biologie in unserer Zeit* **21**, 26-30.
- Proksch P., Edrada R. A., und Ebel R. (2002) Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biot.* **59**, 125-134.
- Quijano L., Cruz F., Navarrete I., Gómez P., und Rios T. (1994) Alkyl glycerol monoethers in the marine sponge *Desmapsamma anchorata*. *Lipids* **29**, 731-734.
- Quirk M. M., Wardroper A. M. K., Wheatley R. E., und Maxwell J. R. (1984) Extended hopanoids in peat environments. *Chem. Geol.* **42**, 25-43.

- Raederstorff D., Shu A. Y. L., Thompson J. E., und Djerassi C. (1987) Biosynthetic studies of marine lipids. 11. Synthesis, biosynthesis, and absolute configuration of the internally branched demospongiic acid, 22-methyl-5,9-octacosadienoic acid. *J. Org. Chem.* **52**, 2337-2346.
- Rager M.-N. und Metzger P. (2000) Six novel tetraterpenoid ethers, lycopanerols B-G, and some other constituents from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* **54**, 427-437.
- Rajendran N., Matsuda O., Imamura N., und Urushigawa Y. (1992) Variation in microbial biomass and community structure in sediments of eutrophic bays as determined by phospholipid ester-linked fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 562-571.
- Ravenschlag K., Sahn K., und Amann R. (2001) Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 387-395.
- Reiswig H. M. (1971) Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biological Bulletin* **141**, 568-691.
- Reiswig H. M. (1974) Water transport, respirations and energetics of three tropical marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **14**, 231-249.
- Reiswig H. M. (1975) The aquiferous systems of three marine demospongiae. *Journal of Morphology* **145**, 493-502.
- Reiswig H. M. (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). *Coll. Internat. CNRS* **291**, 173-180.
- Reiswig H. M. (1981) Partial carbon and energy budget of the bacteriosponge *Verongia fistularis* (Porifera: Demospongiae) in Barbados. *Marine Ecology* **2**, 273-293.
- Reitner J. und Mehl D. (1996) Monophyly of the porifera. *Verh. naturwiss. Ver. Hamburg (NF)* **36**, 5-32.
- Reitner J. und Wörheide G. (2002) Non-lithistid fossil Demospongiae - origins of their palaeobiodiversity and highlights in history of preservation. In *Systema Porifera* (ed. J. N. A. Hooper und R. W. M. van Soest), Kluwer. New York. pp. 52-68
- Reysenbach A.-L., Ehringer M., und Hershberger K. L. (2000) Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the *Aquificales* and "*Korarchaeota*" coexist. *Extremophiles* **4**, 61-67.
- Rezanka T. (1993) Polyunsaturated and unusual fatty acids from slime moulds. *Phytochemistry* **33**, 1441-1444.
- Rezanka T. (1998) Branched and very long-chain dicarboxylic acids from *Equisetum* species. *Phytochemistry* **47**, 1539-1543.
- Rezanka T., Cudlín J., und Podojil M. (1987) Very-long-chain fatty acids from lower organisms. *Folia Microbiologica* **22**, 149-176.
- Rezanka T., Sokolov M. Y., und Viden I. (1990) Unusual and very-long-chain fatty acids in *Desulfotomaculum*, a sulfate-reducing bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 231-238.
- Richelle-Maurer E., Braekman J.-C., De Kluijver M. J., Gomez R., van de Vyver G., Van Soest R. W. M., und Devijver C. (2001) Cellular location of (2R, 3R, 7Z)-2-aminotetradec-7-ene-1, 3-diol, a potent antimicrobial metabolite produced by the Caribbean sponge *Haliclona vansoesti*. *Cell and Tissue Research* **306**, 157-165.
- Richnow H. H., Jenisch A., und Michaelis W. (1992) Structural investigations of sulphur-rich macromolecular oil fractions and a kerogen by *sequential* chemical degradation. *Org. Geochem.* **19**, 351-370.
- Riding R. und Zhuravlev A. Y. (1995) Structure and diversity of oldest sponge-microbe reefs: Lower Cambrian, Aldan River, Siberia. *Geology* **23**, 649-652.
- Ries-Kautt M. und Albrecht P. (1989) Hopane-derived triterpenoids in soils. *Chem. Geol.* **76**, 143-151.
- Risatti J. B., Rowland S. J., Yon D. A., und Maxwell J. R. (1984) Stereochemical studies of acyclic isoprenoids - XII. Lipids of methanogenic bacteria and possible contributions to sediments. *Org. Geochem.* **6**, 93-104.
- Ritchie N. J., Schutter M. E., Dick R. P., und Myrold D. D. (2000) Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1668-1675.

- Rivera M. C. und Lake J. A. (1992) Evidence that Eukaryotes and Eocyte Prokaryotes are immediate relatives. *Science* **257**, 74-76.
- Roberts J. M., Long D., Wilson J. B., Mortensen P. B., und Gage J. D. (2003) The cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and enigmatic seabed mounds along the north-east Atlantic margin: are they related? *Marine Pollution Bulletin* **46**, 7-20.
- Rohmer M., Bisseret P., und Neunlist S. (1992) The hopanoids, prokaryotic triterpenoids and precursors of ubiquitous molecular fossils. In *Biological Markers in Sediments and Petroleum* (ed. J. M. Moldowan, P. Albrecht, und R. P. Philp), Englewood Cliffs. Prentice-Hall. pp. 1-17
- Rohmer M., Bouvier-Navé P., und Ourisson G. (1984) Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1137-1150.
- Rohmer M., Dastillung M., und Ourisson G. (1980) Hopanoids from C<sub>30</sub> to C<sub>35</sub> in recent muds. *Naturwissenschaften* **67**, 456-458.
- Rohmer M. und Ourisson G. (1976) Méthyl-hopanes d'*Acetobacter xylinum* et d'*Acetobacter rancens*: une nouvelle famille de composés triterpéniques. *Tetrahedron Lett.* **40**, 3641-3644.
- Rosa-Putra S., Nalin R., Domenach A.-M., und Rohmer M. (2001) Novel hopanoids from *Frankia* spp. and related soil bacteria - Squalene cyclization and significance of geological biomarkers revisited. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4300-4306.
- Roth L. R., Moreau R. A., Powell M. J., und O'Brien D. J. (1995) Semipreparative separation of intact hopanoids from *Zymomonas mobilis*. *Anal. Biochem.* **224**, 302-308.
- Rowe N. J., Tunstall J., Galbraith L., und Wilkinson S. G. (2000) Lipid composition and taxonomy of [*Pseudomonas*] *echinoides*: transfer to the genus *Sphingomonas*. *Microbiology* **146**, 3007-3012.
- Rowland S. J. (1990) Production of acyclic isoprenoid hydrocarbons by laboratory maturation of methanogenic bacteria. *Org. Geochem.* **15**, 9-16.
- Russell N. J. (1984) Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *TIBS*, 108-112.
- Russell N. J. (1990) Cold adaptation of microorganisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **326**, 595-611.
- Russell N. J. und Fukunaga N. (1990) A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **75**, 171-182.
- Russell N. J. und Nichols D. S. (1999) Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiology* **145**, 767-779.
- Rütters H., Sass H., Cypionka H., und Rullkötter J. (2001) Monoalkylether phospholipids in the sulfate-reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Arch. Microbiol.* **176**, 435-442.
- Rützler K. (1985) Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In *New Perspectives in Sponge Biology* (ed. K. Rützler), Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. London. pp. 455-466
- Ryhage R. und Stenhagen E. (1960) Mass spectrometry in lipid research. *J. Lipid Res.* **1**, 361-390.
- Sahm K. und Berninger U.-G. (1998) Abundance, vertical distribution, and community structure of benthic prokaryotes from permanently cold marine sediments (Svalbard, Arctic Ocean). *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **165**, 71-80.
- Santavy D. L. und Colwell R. R. (1990) Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **67**, 73-82.
- Santavy D. L., Willenz P., und Colwell R. R. (1990) Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1750-1762.
- Sarà M. und Liaci L. (1964) Symbiotic association between zooxanthellae and two marine sponges of the genus *Cliona*. *Nature* **203**, 321-323.
- Sarà M. und Vacelet J. (1973) Ecologie des démosponges. In *Traité de zoologie*, Vol. 3 (1), *Spongiaires* (ed. P.P.Grassé), Masson. Paris. pp. 462-576
- Scheuerbrandt G., Goldfine H., Baronowsky P. E., und Bloch K. (1961) A novel mechanism for the biosynthesis of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **236**.
- Schiraldi C., Giuliano M., und De Rosa M. (2002) Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea* **1**, 75-86.

- Schlegel H. G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme. Stuttgart - New York. pp.634
- Schleper C., DeLong E. F., Preston C. M., Feldman R. A., K.Y W., und Swanson R. V. (1998) Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **180**, 5003-5009.
- Schmidt E. W., Obraztsova A. Y., Davidson S. K., Faulkner D. J., und Haygood M. G. (2000) Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel  $\delta$ -proteobacterium, "*Candidatus* Enttheonella palauensis". *Mar. Biol.* **136**, 969-977.
- Schmidt T. E., DeLong E. F., und Pace N. R. (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**, 4371-4378.
- Schmitz F. J. (1994) Cytotoxic compounds from sponges and associated microfauna. In *Sponges in time and space* (ed. R. W. M. van Soest, T. M. G. van Kempen, und J.-C. Braekman), Balkema. Rotterdam. pp. 485-496
- Schmitz F. J., Vanderah D. J., Hollenbeak K. H., Enwall C. E. L., Gopichand Y., SenGupta P. K., Hossain M. B., und v.d.Helm D. (1983) Metabolites from the marine sponges *Tedania ignis*. A new atisanediol and several known diketopiperazines. *J. Org. Chem.* **48**, 3941-3945.
- Schopf J. W. (1993) Microfossils of the early Archaean Apex Chert: New evidence of the antiquity of life. *Science* **260**, 640-646.
- Schouten S., Hoefs M. J. L., Koopmans M. P., Bosch H.-J., und Sinninghe Damsté J. S. (1998) Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Org. Geochem.* **29**, 1305-1319.
- Schouten S., Hopmans E. C., Pancost R. D., und Sinninghe Damsté J. S. (2000) Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14421-14426.
- Schouten S., van der Maarel M. J. E. C., Huber R., und Sinninghe Damsté J. S. (1997) 2,6,10,15,19-Pentamethylcosenes in *Methanobolus bombayensis*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Org. Geochem.* **26**, 409-414.
- Schumann-Kindel G., Bergbauer M., Manz W., Szewzyk U., und Reitner J. (1997) Aerobic and anaerobic microorganisms in modern sponges: a possible relationship to fossilization-processes. *Facies* **26**, 268-272.
- Schumann-Kindel G., Bergbauer M., und Reitner J. (1996) Bacteria associated with Mediterranean sponges. In *Global and regional controls on biogenic sedimentation. I. Reef evolution. Research reports.*, Vol. Sonderband 2 (ed. J. Reitner, F. Neuweiler, und F. Gunkel), Göttinger Arbeiten zur Geologie und Paläontologie. Göttingen. pp. 125-128
- Seemann M., Bisseret P., Tritz J.-P., Hooper A. B., und Rohmer M. (1999) Novel bacterial triterpenoids of the hopane series from *Nitrosomonas europaea* and their significance for the formation of the C<sub>35</sub> bacteriohopane skeleton. *Tetrahedron Lett.* **40**, 1681-1684.
- Sellek G. A. und Chaudhuri J. B. (1999) Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology* **25**, 471-482.
- Shatz M., Yosief T., und Kashman Y. (2000) Bacteriohopanehexol, a new triterpene from the marine sponge *Petrosia* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 1554-1556.
- Shaw P. M. und Johns R. B. (1985) Organic geochemical studies of a recent Inner Great Barrier Reef sediment-I. Assessment of input sources. *Org. Geochem.* **8**, 147-156.
- Shiba T. und Simidu U. (1982) *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll *a*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 211-217.
- Shieh W. Y. und Lin Y. M. (1994) Association of heterotrophic nitrogen-fixing bacteria with a marine sponge of *Halichondria* sp. *Bull. Mar. Sci.* **54**, 557-564.
- Shigemori H., Bae M.-A., Yazawa K., Sasaki T., und Kobayashi J. (1992) Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*. *J. Org. Chem.* **57**, 4317-4320.
- Shimada H., Nemoto N., Shida Y., Oshima T., und Yamagishi A. (2002) Complete polar composition of *Thermoplasma acidophilum* HO-62 determined by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Bacteriol.* **184**, 556-563.

- Shin B. A., Kim Y. R., Lee I.-S., Sung C. K., Hong J., Sim C. J., Im K. S., und Jung J. H. (1999) Lyso-PAF analogues and Lysophosphatidylcholines from the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of Cholesterol biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **62**, 1554-1557.
- Sinninghe Damsté J. S., Rijpstra W. I. C., Hopmans E. C., Prahl F. G., Wakeham S. G., und Schouten S. (2002a) Distribution of membrane lipids of planktonic *Crenarchaeota* in the Arabian Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2997 - 3002.
- Sinninghe Damsté J. S., Schouten S., Hopmans E. C., van Duin A. C. T., und Geenevasen J. A. J. (2002b) Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J. Lipid Res.* **43**, 1641-1654.
- Sinninghe Damsté J. S., Strous M., Rijpstra W. I. C., Hopmans E. C., Geenevasen J. A. J., van Duin A. C. T., van Niftrik L. A., und Jetten M. S. M. (2002c) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**, 708-712.
- Sinninghe Damsté J. S., van Duin A. C. T., Hollander D., Kohnen M. E. L., und De Leeuw J. W. (1995) Early diagenesis of bacteriohopanepolyol derivatives: Formation of fossil homohopanoids. *Geochim. Cosmochim. Acta* **59**, 5141-5147.
- Smith G. A., Nickels J. S., Kerger B. D., Davis J. D., Collins E., Wilson J. T., McNabb J. F., und White D. C. (1986) Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in subsurface material: a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. *Canadian Journal of Microbiology* **32**, 104-111.
- Smith G. M. und Djerassi C. (1987) Phospholipid studies of marine organisms: 14. Ether lipids of the sponge *Tethya aurantia*. *Lipids* **22**, 236-240.
- Smith P. F. (1988) Archaeobacteria and other specialized bacteria. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 489-553
- Snyder F. (1999) The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 265-278.
- Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., und Francke W. (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **43**, 3385-3386.
- Springer B., Tortoli E., Richter I., Grünewald R., Rüscher-Gerdes S., Uschmann K., Suter F., Collins M. D., Kroppenstedt R. M., und Böttger E. C. (1995) *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2805-2811.
- Spröer C., Lang E., Hobeck P., Burghardt J., Stackebrandt E., und Tindall B. J. (1998) Transfer of *Pseudomonas nautica* to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1445-1448.
- Sprott G. D., Agnew B. J., und Patel G. B. (1997) Structural features of ether lipids in the archaeobacterial thermophiles *Pyrococcus furiosus*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanothermus fervidus*, and *Sulfolobus acidocaldarius*. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 467-476.
- Stetter K. O. (1996) Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **18**, 149-158.
- Stetter K. O., Fiala G., Huber G., Huber R., und Segerer A. (1990) Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* **75**, 117-124.
- Stierle A. C., Cardellina II J. H., und Singleton F. L. (1988) A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* **44**, 1021.
- Stierle D. B. und Stierle A. C. (1992) Pseudomonic acid derivatives from a marine bacterium. *Experientia* **48**, 1165-1169.
- Stryer L. (1995) *Biochemie*. Springer-Verlag. Heidelberg Berlin Oxford. pp.1125
- Summons R. E. (1987) Branched alkanes from ancient and modern sediments: Isomer discrimination by GC/MS with multiple reaction monitoring. *Org. Geochem.* **11**, 281-289.
- Summons R. E., Brassell S. C., Eglinton G., Evans E., Horodyski R. J., Robinson N., und Ward D. M. (1988) Distinctive hydrocarbon biomarkers from fossiliferous sediments of the Late Proterozoic Wallcott member, Chuar Group, Grand Canyon, Arizona. *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**, 2625-2637.
- Summons R. E., Jahnke L. L., Hope J. M., und Logan G. A. (1999) 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**, 554 - 557.
- Summons R. E., Jahnke L. L., und Roksandic Z. (1994) Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria: Relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 2853-2863.



- Suutari M. und Laakso S. (1992) Unsaturated and branched chain-fatty acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 119-124.
- Svetashev V. I., Vysotskii M. V., Ivanova E. P., und Mikhailov V. V. (1995) Cellular fatty acids of *Alteromonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 37-43.
- Swinnerton J. W. und Linnenbom V. J. (1967) Determination of the C1 to C4 hydrocarbons in sea water by gas chromatography. *Journal of gas chromatography* **5**, 570-573.
- Tabachnik K. R. (1991) Adaption of the hexactinellid sponges to deep-sea life. In *Fossil and recent sponges* (ed. J. Reitner und H. Keupp), Springer-Verlag, Berlin. pp. 378-386
- Takizawa M., Colwell R. R., und Hill R. T. (1993) Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 997-1002.
- Talbot M., Watson D. F., Murrell J. C., Carter J. F., und Farrimond P. (2001) Analysis of intact bacteriohopanepolyols from methanotrophic bacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **921**, 175-185.
- Taylor J. und Parkes R. J. (1983) The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3303-3309.
- Taylor R. F. (1984) Bacterial triterpenoids. *Microbiol. Rev.* **48**, 181-198.
- Teske A., Hinrichs K.-U., Edgcomb V., de Vera Gomez A., Kysela D., Sylva S. P., Sogin M. L., und Jannasch H. W. (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1994-2007.
- Thacker R. W. und Starnes S. (2003) Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* in marine sponges, *Dysidea* spp. *Mar. Biol.* **142**, 643-648.
- Thauer R. K. und Fuchs G. (1979) Methanogene Bakterien - Ungewöhnliche Zellkomponenten und Stoffwechselwege in einer Bakteriengruppe mit phylogenetischer Sonderstellung. *Naturwissenschaften* **66**, 89-94.
- Thiel V. (1997) Organische Verbindungen in Porifera und biogenen Carbonaten. Dissertation, Universität Hamburg. Hamburg.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S. A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., und Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 60-66.
- Thiel V., Blumenberg M., Pape T., Seifert R., und Michaelis W. (2003) Unexpected occurrence of hopanoids at gas seeps in the Black Sea. *Org. Geochem.* **34**, 81-87.
- Thiel V., Jenisch A., Wörheide G., Löwenberg A., Reitner J., und Michaelis W. (1999a) Mid-chain branched alkanolic acids from "living fossil" demosponges: A link to ancient sedimentary lipids? *Org. Geochem.* **30**, 1-14.
- Thiel V., Peckmann J., Richnow H. H., Luth U., Reitner J., und Michaelis W. (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Mar. Chem.* **73**, 97-112.
- Thiel V., Peckmann J., Seifert R., Wehrung P., Reitner J., und Michaelis W. (1999b) Highly isotopically depleted isoprenoids: Molecular markers for ancient methane venting. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 3959-3966.
- Thomas H. (2002) Remineralization ratios of carbon, nutrients, and oxygen in the North Atlantic Ocean: A field databased assessment. *Global Biogeochem. Cycles* **16**, 24/1-24/12.
- Thompson D. H., Wong K. F., Humphry-Baker R., Wheeler J. J., Kim J.-K., und Ranavavare S. B. (1992) Tetraether bolaform amphiphiles as models of archaeobacterial membrane lipids: Raman spectroscopy, <sup>13</sup>P NMR, X-ray scattering, and electron microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9035-9042.
- Thompson G. A. J. (1972) Ether-linked lipids in protozoa. In *Ether lipids* (ed. F. Snyder), Academic Press. New York. pp. 321
- Thompson I. P., Bailey M. J., Ellis R. J., und Purdy K. J. (1993) Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 75-84.
- Thoms C., Horn M., Wagner M., Hentschel U., und Proksch P. (2003) Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar. Biol.* **142**, 685-692.

- Thurman E. M. (1985) Organic carbon in natural waters: amount, origin, and classification. In *Organic geochemistry of natural waters* (ed. E. M. Thurman), Martinus Nijhoff. Dordrecht. pp. 7-66
- Torkko P., Suomalainen S., Iivanainen E., Tortoli E., Suutari M., Seppänen J., Paulin L., und Katila M.-L. (2002) *Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing mycobacterium isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish stream waters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1519-1525.
- Torkko P., Suutari M., Suomalainen S., Paulin L., Larsson L., und Katila M.-L. (1998) Separation among species of *Mycobacterium terrae* complex by lipid analyses: comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 499-505.
- Tornabene T. G. und Langworthy T. A. (1978) Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science* **203**, 51-53.
- Tornabene T. G., Langworthy T. A., Holzer G., und Oró J. (1979) Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic "archaeobacteria". *J. Mol. Evol.* **13**, 73-83.
- Tornabene T. G., Wolfe R. S., Balch W. E., Holzer G., Fox G. E., und Oró J. (1978) Phytanyl-glycerol ethers and squalenes in the archaeobacterium *Methanobacterium Thermoautotrophicum*. *J. Mol. Evol.* **11**, 259-266.
- Turon X., Becerro M. A., und Uriz M. J. (2000) Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of x-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Res.* **301**, 311-322.
- Uchida K. (1974a) Lipids of alcoholophilic Lactobacilli - II. Occurrence of polar lipids with unusually long acyl chains in *Lactobacillus heterohiochii*. *Biochim. Biophys. Acta* **369**, 146-155.
- Uchida K. (1974b) Occurrence of saturated and mono-unsaturated fatty acids with unusually-long-chains (C<sub>20</sub>-C<sub>30</sub>) in *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholophilic bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* **348**, 86-93.
- Uchino Y., Hirata A., Yokota A., und Sugiyama J. (1998) Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 201-210.
- Ueki A. und Suto T. (1979) Cellular fatty acid composition of sulfate-reducing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**, 185-196.
- Unson M. D. und Faulkner D. J. (1993) Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia* **49**, 349-353.
- Unson M. D., Holland N. D., und Faulkner D. J. (1994) A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* **119**, 1-11.
- Upasani V. N., Desai S. G., Moldoveanu N., und Kates M. (1994) Lipids of extremely halophilic archaeobacteria from saline environments in India: a novel glycolipid in *Natronobacterium* strains. *Microbiology* **140**, 1959-1966.
- Urdaci M. C., Marchand M., und Grimont P. A. D. (1990) Characterization of 22 *Vibrio* species by gas chromatography analysis of their cellular fatty acids. *Research in Microbiology* **141**, 437-452.
- Uriz M., Turon X., Galera J., und Tur J. M. (1996) New light on the cell location of avarol within the sponge *Dysidea avara* (Dendroceratida). *Cell and Tissue Research* **285**, 519-527.
- Vacelet J. (1970) Description de cellules á bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. *Journal de microscopie* **9**, 333-346.
- Vacelet J. (1971) Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée chroococcale et une éponge du genre *Verongia*. *Journal de microscopie* **12**, 363-380.
- Vacelet J. (1975) Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *Journal de microscopie et de biologie cellulaire* **23**, 271-288.
- Vacelet J., Boury-Esnault N., Fiala-Médioni A., und Fisher C. R. (1995) A methanotrophic carnivorous sponge. *Nature* **377**, 296.
- Vacelet J. und Donadey C. (1977) Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **30**, 301-314.

- Vacelet J., Fiala-Médioni A., Fisher C. R., und Boury-Esnault N. (1996) Symbiosis between methane-oxidizing bacteria and a deep-sea carnivorous cladorhizid sponge. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **145**, 77-85.
- Vainshtein M., Hippe H., und Kroppenstedt R. M. (1992) Cellular fatty acid composition of *Desulfovibrio* species and its use in classification of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 554-566.
- van de Peer Y. und De Wachter R. (1997) Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variations in 18S rRNA. *J. Mol. Evol.* **45**, 619-630.
- van de Vossenberg J. L. C. M., Driessen A. J. M., und Konings W. N. (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163-170.
- van der Maarel M. J. E. C., Artz R. R. E., Haanstra R., und Forney L. J. (1998) Association of marine Archaea with the digestive tracts of two marine fish species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2894-2898.
- van Dorsselaer A., Albrecht P., und Ourisson G. (1977) Identification of novel (17 $\alpha$ H)-hopanes in shales, coals, lignites, sediments and petroleum. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1-2**, 165-170.
- Vancanneyt M., Witt S., Abraham W.-R., Kersters K., und Fredrickson H. L. (1996) Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of Pseudomonads: a taxonomic evaluation. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**, 528-540.
- Vandamme E. J. (1994) The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. *Journal of Biotechnology* **37**, 89-108.
- Vetriani C., Jannasch H. W., MacGregor B. J., Stahl D. A., und Reysenbach A.-L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4375-4384.
- Vetriani C., Reysenbach A.-L., und Doré J. (1998) Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 83-88.
- Viden I. und Rezanka T. (1987) Capillary gas chromatography-mass spectrometry of aliphatic saturated  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acid dimethyl esters and direct inlet mass spectrometry of the corresponding free acids. *J. Chromatogr.* **408**, 145-155.
- Vilcheze C., Llopiz P., Neunlist S., Poralla K., und Rohmer M. (1994) Prokaryotic triterpenoids: new hopanoids from the nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter vinelandii*, *Beijerinckia indica* and *Beijerinckia mobilis*. *Microbiology* **140**, 2749-2753.
- Vincenti M., Guglielmetti G., Cassani G., und Tonini C. (1987) Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* **59**, 694-699.
- Volkman J. K. und Johns R. B. (1977) The geochemical significance of positional isomers of unsaturated acids from an intertidal zone sediment. *Nature* **267**, 693-694.
- Volkman J. K., Johns R. B., Gillan F. T., und Perry G. J. (1980) Microbial lipids of an intertidal sediment - I. Fatty acids and hydrocarbons. *Geochim. Cosmochim. Acta* **44**, 1133-1143.
- von Wallbrunn A., Richnow H. H., Neumann G., Meinhardt F., und Heipieper H.-J. (2003) Mechanism of *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**, 1730-1733.
- Wagner F., Rottem S., Held H.-D., Uhlig S., und Zähringer U. (2000) Ether lipids in the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6276-6286.
- Wakeham S. G. (1999) Monocarboxylic, dicarboxylic and hydroxy acids released by sequential treatments of suspended particles and sediments of the Black Sea. *Org. Geochem.* **30**, 1059-1074.
- Wakeham S. G., Freeman K. H., Pease T. K., und Hayes J. M. (1993) A photoautotrophic source for lycopane in marine water columns. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**, 159-165.
- Wakeham S. G., Lewis C. M., Hopmans E. C., Schouten S., und Sinninghe Damsté J. S. (2003) Archaea mediate anaerobic oxidation of methane in deep euxinic waters of the Black Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta* **67**, 1359-1374.
- Walkup R. D., Jamieson G. C., Ratcliff M. R., und Djerassi C. (1981) Phospholipid studies of marine organisms: 2. Phospholipids, phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) (= *Verongia thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids* **16**, 631-646.

- Watson D. F. und Farrimond P. (2000) Novel polyfunctionalised geohopanoids in a recent lacustrine sediment (Priest Pot, UK). *Org. Geochem.* **31**, 1247-1252.
- Weber F. J., Isken S., und de Bont J. A. M. (1994) *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**, 2013-2017.
- Webster N. S. und Hill R. T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an  $\alpha$ -Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**, 843-851.
- Webster N. S., Watts J. E. M., und Hill R. T. (2001a) Detection and phylogenetic analysis of novel Crenarchaeote and Euryarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier reef sponge. *Mar. Biotechnol.* **3**, 600-608.
- Webster N. S., Wilson K. J., Blackall L. L., und Hill R. T. (2001b) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 434-444.
- Welch D. F. (1991) Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 422-438.
- White D. C., Bobbie R. J., King R. J., Nickels J. S., und Amoe P. (1979a) Lipid analysis of sediments for microbial biomass and community structure. In *Methodology for Biomass Determinations and Microbial Activities in Sediments* (ed. C. D. Litchfield und P. L. Seyfried), American Society for Testing Materials. pp. 87-103
- White D. C., Davis W. M., Nickels J. S., King J. D., und Bobbie R. J. (1979b) Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**, 51-62.
- White D. C. und Findlay J. A. (1988) Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms. *Hydrobiologia* **159**, 119-132.
- White D. C., Stair J. O., und Ringelberg D. B. (1996) Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 185-196.
- Wilkinson C. R. (1978a) Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 161-167.
- Wilkinson C. R. (1978b) Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial population. *Mar. Biol.* **49**, 169-176.
- Wilkinson C. R. (1978c) Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**, 177-185.
- Wilkinson C. R. (1983) Net primary productivity in coral reef sponges. *Science* **219**, 410-412.
- Wilkinson C. R. (1984) Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbiosis in marine sponges. *Proc. R. Soc. Lond. B* **220**, 509-517.
- Wilkinson C. R. und Fay P. (1979) Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* **279**, 527-529.
- Wilkinson C. R., Garrone R., und Vacelet J. (1984) Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. *Proc. R. Soc. Lond. B* **220**, 519-528.
- Wilkinson C. R., Nowak M., Austin B., und Colwell R. R. (1981) Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microb. Ecol.* **7**, 13-21.
- Wilkinson C. R., Summons R. E., und Evans E. (1999) Nitrogen fixation in symbiotic marine sponges: ecological significance and difficulties in detection. *Mem. Queensl. Mus.* **44**, 667-673.
- Wilkinson S. G. (1988) Gram-negative bacteria. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 299-488
- Willenz P. und Hartmann W. D. (1989) Micromorphology and ultrastructure of Caribbean sclerosponges. I. *Ceratoporella nicholsoni* and *Stromatospongia norae* (Ceratoporellidae: Porifera). *Mar. Biol.* **103**, 387-401.
- Woese C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Woese C. R. und Fox G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5090.

- Woese C. R., Kandler O., und Wheelis M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
- Wolff R. L., Christie W. W., und Marpeau A. M. (1999) Reinvestigation of the Polymethylen-interrupted 18:2 and 20:2 acids of *Ginkgo biloba* seed lipids. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 273-276.
- Wood B. J. B. (1988) Lipids of algae and protozoa. In *Microbial lipids*, Vol. 1 (ed. C. Ratledge und S. B. Wilkinson), Academic Press. London, United Kingdom. pp. 807-867
- Xiao S., Zhang Y., und Knoll A. H. (1998) Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a neoproterozoic phosphorite. *Nature* **391**, 553 - 558.
- Yabuuchi E., Yano I., Oyaizu H., Hashimoto Y., Ezaki T., und Yamamoto H. (1990) Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiology and Immunology* **34**, 99-119.
- Yagüe G., Segovia M., und Valero-Guillén P. L. (2003) Phospholipid composition of several clinically relevant *Corynebacterium* species as determined by mass spectrometry: an unusual fatty acyl moiety is present in inositol-containing phospholipids of *Corynebacterium urealyticum*. *Microbiology* **149**, 1675-1685.
- Yamauchi K., Doi K., Yoshida Y., und Kinoshita M. (1993) Archaeobacterial lipids: highly proton-impermeable membranes from 1,2-diphytanyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 178-182.
- Yazawa K. (1996) Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. *Lipids* **31**, S-297-S-300.
- Yumoto I., Kawasaki K., Iwata H., Matsuyama H., und Okuyama H. (1998) Assignment of *Vibrio* sp. strain ABE-1 to *Colwellia maris* sp. nov., a new psychrophilic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1357-1362.
- Yurkov V. V. und Beatty J. T. (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 695-724.
- Zelles L. (1997) Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* **35**, 275-294.
- Zelles L. (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* **29**, 111-129.
- Zhao N., Berova N., Nakanishi K., Rohmer M., Mougnot P., und Jürgens U. J. (1996) Structures of two bacteriohopanoids with acyclic pentol side-chains from the cyanobacterium *Nostoc* PCC 6720. *Tetrahedron* **52**, 2777-2788.
- Zimmerman M. P., Hoberg M., Ayanoglu E., und Djerassi C. (1990) Cell separation of *Tethya aurantia*, an analytical study of embryonic and differentiated sponge cells. *Lipids* **25**, 383-390.
- Zimmerman M. P., Thomas F. C., Thompson J. E., Djerassi C., Streiner H., Evans E., und Murphy P. T. (1989) The distribution of lipids and sterols in cell types from the marine sponge *Pseudaxinyssa* sp. *Lipids* **24**, 210-216.
- Zundel M. und Rohmer M. (1985a) Prokaryotic triterpenoids 1. 3 $\beta$ -methylhopanoids from *Acetobacter* species and *Methylococcus capsulatus*. *Eur. J. Biochem.* **150**, 23-27.
- Zundel M. und Rohmer M. (1985b) Prokaryotic triterpenoids. 3. The biosynthesis of 2 $\beta$ -methylhopanoids and 3 $\beta$ -methylhopanoids of *Methylobacterium organophilum* and *Acetobacter pasteurianus* ssp. *pasteurianus*. *Eur. J. Biochem.* **150**, 35-39.



## Abbildungen

	<u>Seite</u>	
<b>Abbildung 2.1</b>	Phylogenetisches System der Biosphäre basierend auf vergleichenden rRNA-Analysen	6
<b>Abbildung 2.2</b>	Kalottenmodell eines Phospholipidmoleküls	8
<b>Abbildung 2.3</b>	Schematischer Aufbau von Lipiddoppelschichten und biologischen Membranen	8
<b>Abbildung 2.4</b>	Struktur von a) <i>sn</i> -1,2-Diacylglycerolesterlipiden und b) <i>sn</i> -2,3-Dialkylglyceroletherlipiden	9
<b>Abbildung 2.5</b>	Schematischer Aufbau der Einzelschicht- bzw. Doppelschichtmembranen in Archaea. a) extrem halophile, b) alkalophile, c) methanogene und d) thermoacidophile Archaea	9
<b>Abbildung 2.6</b>	Phylogenetischer Stammbaum der Bacteria	10
<b>Abbildung 2.7</b>	Aufbau der Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien	11
<b>Abbildung 2.8</b>	Formen bakterieller Zellen	11
<b>Abbildung 2.9</b>	Phylogenetischer Stammbaum der Archaea	13
<b>Abbildung 2.10</b>	Strukturen von Di- und Tetraetherlipiden am Beispiel des Archaeols (2,3-di- <i>O</i> -phytyl- <i>sn</i> - glycerol) und des Caldarchaeols (2,3,2',3'-tetra- <i>O</i> -dibiphytyl-di- <i>sn</i> -glycerol)	15
<b>Abbildung 2.11</b>	Schematischer Querschnitt durch einen Schwammkörper	16
<b>Abbildung 2.12</b>	TEM-Mikrograph des Gewebes von <i>G. barretti</i> mit Bakterienzellen unterschiedlicher Morphotypen. SAB = Schwammassoziierte Bakterien, Sz = Schwammzelle, Maßstab 2,5 µm	17
<b>Abbildung 3.1</b>	Position des Sula-Rückens auf dem mittelnorwegischen Schelf	29
<b>Abbildung 3.2</b>	Bathymetrie und Strömungsrichtungen der Wassermassen im Gebiet des mittelnorwegischen Schelfs	30
<b>Abbildung 3.3</b>	Temperatur-Salinität-Profil (Fieren) am Sula-Rücken (64:04:25N, 08:01:60E) August 1999	30
<b>Abbildung 3.4</b>	<i>In-situ</i> -pH-Werte am Sula-Rücken	31
<b>Abbildung 3.5</b>	Methankonzentrationen am Sula-Rücken	32
<b>Abbildung 3.6</b>	Beprobungslokalitäten der untersuchten Schwämme	35
<b>Abbildung 3.7</b>	Übersichtsaufnahmen von aus <i>Geodia phlegraei</i> isolierten Bakterienstämmen. a) <i>Roseobacter</i> sp. ( $\alpha$ -Proteobacteria) b) <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ( $\gamma$ -Proteobacteria) (Bildmaterial: AG Prof. Szewzyk, TU Berlin)	37
<b>Abbildung 4.1</b>	Partielle Gaschromatogramme der FAME-Fractionen aus a) <i>Erythrobacter longus</i> ( $\alpha$ -Proteobacteria), b) <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> ( $\gamma$ -Proteobacteria) und c) <i>Bacillus firmus</i> (Firmicutes)	43
<b>Abbildung 4.2</b>	<i>n</i> -C <sub>18:1</sub> / <i>n</i> -C <sub>16:1</sub> -Verhältnisse (Gew.-%) in ausgewählten Proteobakterien-Isolaten	45
<b>Abbildung 4.3</b>	Partieller GC-Lauf der FAME-Fraktion aus <i>Colwellia</i> sp.	47

<b>Abbildung 4.4</b>	MS-Fragmentierungsschema des <i>N</i> -Octadeca-5,11-dienoylpyrrolidins aus Hal 17b ( $\alpha$ -Proteobakterium)	48
<b>Abbildung 4.5</b>	Massenspektrum des 10-MethylhexadecansäureME	49
<b>Abbildung 4.6</b>	MS-Fragmentierung des Pyrrolidin-Derivats des 11-Methyloctadec-11-ensäureME aus <i>Erythrobacter longus</i>	50
<b>Abbildung 4.7</b>	Strukturformel der FA-umfassenden Teilstruktur des ‚Lipid A‘ aus $\gamma$ -Proteobakterien	50
<b>Abbildung 4.8</b>	Massenspektren des 2-OH-HexadecansäureME und des 3-OH-HexadecansäureME	51
<b>Abbildung 5.1</b>	Partielle Gaschromatogramme der FAME aus <i>Thenea muricata</i> und <i>Geodia barretti</i> .	56
<b>Abbildung 5.2</b>	Gaschromatogramme der FAME aus <i>P. carrageenovora</i> und <i>G. barretti</i>	57
<b>Abbildung 5.3</b>	Strukturformel der Arachidonsäure	58
<b>Abbildung 5.4</b>	Verteilung dominanter SCFA-Klassen in Demospongiae und Hexactinellida	61
<b>Abbildung 5.5</b>	Mengenverhältnisse <i>n</i> -SCFA/LCFA in Demospongiae	64
<b>Abbildung 5.6</b>	Mengenverhältnisse monoen-SCFA/LCFA in Demospongiae	66
<b>Abbildung 5.7</b>	Mengenverhältnisse terminal monomethylverzweigter SCFA/LCFA in Demospongiae	69
<b>Abbildung 5.8</b>	Mengenverhältnisse mittkettig methylverzweigter SCFA/LCFA in Demospongiae	71
<b>Abbildung 5.9</b>	Aus Bakterien bekannte Cyclopropylsäuren: a) 9,10-Cyclopropylhexadecansäure, b) 9,10-Cyclopropyloctadecansäure (Dihydrosterculinsäure) und c) 11,12-Cyclopropyloctadecansäure (Lactobacillinsäure)	73
<b>Abbildung 5.10</b>	Ausschnitt des MS-Spektrums des <i>N</i> -acyl-Pyrrolidids und daraus abgeleitete Struktur (10,13-Dimethyltetradecansäure)	75
<b>Abbildung 5.11</b>	Strukturformel und MS-Fragmentierung des $\alpha$ -MeO-HexadecansäureME aus <i>Farrea</i> (?) sp.	77
<b>Abbildung 5.12</b>	Strukturformel der 15,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure	78
<b>Abbildung 5.13</b>	Strukturformeln der <i>iso</i> -Pentadecansäure und der 13,16-Dimethyltriacontan-1,30-dicarbonsäure	79
<b>Abbildung 5.14</b>	Partielles Gaschromatogramm der FAME aus <i>Geodia barretti</i>	80
<b>Abbildung 5.15</b>	MS-Fragmentierung des C <sub>31:0</sub> -DicarbonsäureDiME	80
<b>Abbildung 5.16</b>	Fragmentmuster des C <sub>31:0</sub> -DicarbonsäureDiME im Scan-Bereich 200 bis 350 amu	81
<b>Abbildung 5.17</b>	Strukturformel und Fragmentierungsschema des 13,16-Dimethyl-1,31-dicarbon-säureDiME	81
<b>Abbildung 5.18</b>	Strukturformel eines 1- <i>O</i> -alkyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholins als Beispiel für ein PAF	84
<b>Abbildung 5.19</b>	Allgemeine Strukturformel natürlicher <i>sn</i> -1- <i>O</i> -Alkylglyceride	85
<b>Abbildung 5.20</b>	Bevorzugte Fragmentierung von 1- <i>O</i> -alkyl-2,3- <i>bis</i> trimethylsilylethern und Spektrum des 1- <i>O</i> -heptadecyl-2,3- <i>bis</i> trimethylsilylethers	88



<b>Abbildung 5.21</b>	Partielles TIC-Chromatogramm der Fraktion a) freier Fettsäuren und b) Ionenspur $m/z = 205$ (Basispeak-Chromatogramm) von MAGE in <i>Haliclona</i> sp.1	89
<b>Abbildung 5.22</b>	Strukturformel eines 1- <i>O</i> -Alk-1'-enyl-glycerids am Beispiel eines Plasmenylethanolamins	91
<b>Abbildung 5.23</b>	Schema der Transformation eines Aldehyds in sein Dimethylacetal mit MeOH	92
<b>Abbildung 5.24</b>	Struktur des Hopanoidgrundgerüsts am Beispiel des Hopans	96
<b>Abbildung 5.25</b>	Teilstrukturen der häufig in Sedimenten auftretenden <i>bishomo</i> -Hopansäure und des <i>bishomo</i> -Hopanols	96
<b>Abbildung 5.26</b>	Strukturformeln ausgewählter bakterieller Hopanoide a) Bakteriohopantetrol (BHT), b) Diplopten, c) Hop-17(21)-en und d) Neohop-13(18)-en	98
<b>Abbildung 5.27</b>	<i>Geodia barretti</i> , geborgen im Korsfjord, Norwegen (Bildmaterial: I. Kaesler)	104
<b>Abbildung 5.28</b>	<i>In-situ</i> -Aufnahme von SAB mit Fluoreszenz-markierten rRNA-spezifischen Oligonukleotid-Sonden im Gewebe von <i>G. barretti</i> (Hoffmann, 2003)	105
<b>Abbildung 5.29</b>	Partielles Gaschromatogramm der FAME in <i>G. barretti</i>	107
<b>Abbildung 5.30</b>	Partielle Gaschromatogramme der FAME aus a) der Cortex, b) dem subcorticalen Mesohyl und c) dem inneren Mesohyl von <i>G. barretti</i>	110
<b>Abbildung 5.31</b>	Anteil kurzkettiger Fettsäureklassen im Lipidinventar verschiedener Gewebestücke eines Exemplars von <i>G. barretti</i>	111
<b>Abbildung 5.32</b>	O <sub>2</sub> -Profil und mikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnittes senkrecht zur Cortex von <i>G. barretti</i> („Sponge 2“) (F. Hoffmann, 2003)	112
<b>Abbildung 5.33</b>	Strukturen häufig auftretender Phosphoglyceride	114
<b>Abbildung 5.34</b>	Schema der DC-Trennung des Phospholipidextrakts von <i>G. macandrewii</i> sowie der käuflichen Standards	116
<b>Abbildung 6.1</b>	Struktur des Archaeols (2,3-di- <i>O</i> -phytanyl- <i>sn</i> -glycerol)	123
<b>Abbildung 6.2</b>	Struktur des Caldarchaeols (2,3,2',3'-tetra- <i>O</i> -dibiphytanyl-di- <i>sn</i> -glycerol)	124
<b>Abbildung 6.3</b>	Struktur des Crenarchaeols	125
<b>Abbildung 6.4</b>	MS-Fragmentierungen und abgeleitete Strukturen eines Pentamethyleicosens aus <i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>	125
<b>Abbildung 6.5</b>	Partielle GC-Läufe der KW-Fractionen nach Spaltung der Etherbindungen aus a) dem Crenarchaeum <i>S. solfataricus</i> sowie b) und c) den Poriferen <i>A. cf. mitsukuri</i> und <i>P. ventilabrum</i> .	127

## Tabellen

	<u>Seite</u>
<b>Tabelle 2.1</b>	Großgruppen der aus Demospongiae beschriebenen Bakterien 22
<b>Tabelle 2.2</b>	Ausgewählte schwammassoziierte Bakterien mit bekannten Sekundärstoffen und ihren Wirkungen 27
<b>Tabelle 3.1</b>	Konzentrationsbereiche der Nährstoffe am Sula-Rücken 32
<b>Tabelle 3.2</b>	Schwammspezies, aus denen die untersuchten SAB isoliert wurden 37
<b>Tabelle 3.3</b>	Vorkommen und Physiologie untersuchter Gattungen der Proteobacteria 38
<b>Tabelle 4.1</b>	Phylogenetische Zugehörigkeit der analysierten Kulturen schwammassoziiierter Bakterien basierend auf der 16S-rRNA-Teilsequenzanalyse 42
<b>Tabelle 4.2</b>	Gesamtgehalte verschiedener Carbonsäureklassen in ausgewählten schwammassoziierten Bakterien 44
<b>Tabelle 4.3</b>	Gehalte der monoen-SCFA und Position ihrer Doppelbindungen $\Delta$ in $\alpha$ - und $\gamma$ -Proteobakterien 46
<b>Tabelle 5.1</b>	Anteile der SCFA ( $\leq C_{19}$ ) an der Fettsäurefraktion ausgewählter Poriferen 59
<b>Tabelle 5.2</b>	Gehalte der mittkettig methylverzweigten Octadecansäure und geschätzte Bakteriendichte in den Poriferen 72
<b>Tabelle 5.3</b>	Auftreten langkettiger $\alpha,\omega$ -DCA in Demospongiae 82
<b>Tabelle 5.4</b>	Verteilung nicht substituierter nichtisoprenoide Monoalkylglyceride aus <i>Haliclona</i> sp. 1 89
<b>Tabelle 5.5</b>	Auftreten nicht substituierter 1-O-MAGE in Hexactinellida und Demospongiae 90
<b>Tabelle 5.6</b>	Auftreten von Dimethylacetalen in den Poriferen 93
<b>Tabelle 5.7</b>	Auftreten ausgewählter Hopanoide in den Schwämmen 100
<b>Tabelle 5.8</b>	Auftreten gebundenen 17 $\beta$ (H),21 $\beta$ (H)-bishomo-Hopan-32-ols in Poriferen nach Behandlung mit H <sub>5</sub> IO <sub>6</sub> /NaBH <sub>4</sub> 101
<b>Tabelle 5.9</b>	Auftreten monomethylverzweigter Fettsäuren in <i>G. barretti</i> 107
<b>Tabelle 5.10</b>	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Carbonsäuren im zentralen Gewebe von <i>G. barretti</i> 108
<b>Tabelle 5.11</b>	Relative Verteilung ausgewählter FA in Gew.-% in den Phospholipidfraktionen aus <i>G. macandrewii</i> 117
<b>Tabelle 6.1</b>	Vorkommen von PME ( $\Delta 1-3$ ) und Lycopan in Demospongiae 126
<b>Tabelle 6.2</b>	Auftreten von Biphytanen in den untersuchten Hexactinellida und Demospongiae 127

## B I Verzeichnis der Poriferen

Hexactinellida

Subklasse	Ordnung	Familie	Spezies	Tiefe [m]	Lokalität	Code
Hexasterophora	Lyssakinosa	Acanthascinae	<i>Staurocalyptus</i> sp.	445	Punta Mangle, Galapagos	HBOI 26-XI-86-1-010
			<i>Acanthascus</i> sp.	440	Punta Vincente, Galapagos	HBOI 32-XI-86-3-015
			<i>H</i> -unknown sp. 1	490	Gulf of Chiriqui, Panama	HBOI 11-XII-95-1-007
		Rosellidae	<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>	440	Isla Bartholomé, Galapagos	HBOI 20-XI-86-3-006
			<i>H</i> -unknown sp. 2	320	Santa Cruz Island, Galapagos	HBOI 15-X-95-1-001
			<i>Sympagella</i> sp. nov.	285	Sula Ridge, Norwegen	POS 31V119922J1-3
			<i>Sympagella</i> cf. <i>nux</i>	380	Isla Marchena, Galapagos	HBOI 19-XI-86-3-005
		Euplectellidae	<i>Euplectella</i> sp.	580	Isla Marchena, Galapagos	HBOI 19-XI-86-1-001
			<i>H</i> -unknown sp. 3	860	Plana Cay, Bahamas	HBOI 4-X-88-2-014
			<i>H</i> -unknown sp. 4	430	Rocas Gordon, Galapagos	HBOI 12-XI-86-1-054
		?	<i>H</i> -unknown sp. 5	480	Lucea, Jamaika	HBOI 23-VIII-93-5-007
			<i>H</i> -unknown sp. 6	335	Teneriffa, Kanarische Inseln	HBOI 9-VI-91-4-016
Hexactinosida		Farreidae	<i>Farrea</i> (?) sp.	215	Charleston Lumps, South Carolina	HBOI 25-V-92-2-010
		Euretidae	<i>Ipheton panicea</i>	480	Turks & Caicos Islands, Karibik	HBOI 30-X-94-1-006
		Aphrocallistidae	<i>Heterochone</i> sp.	475	Isla Marchena, Galapagos	HBOI 19-XI-86-1-022
		?	<i>H</i> -unknown sp. 7	365	Wolf Island, Galapagos	HBOI 20-X-95-3-001
Amphidiscophora	Amphidicosida	Hyalonematidae	<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	375	Negril, Jamaika	HBOI 25-VIII-93-1-001
			<i>Hyalonema</i> sp. 2	800	Long Island, Bahamas	HBOI 21-V-93-1-006
			<i>H</i> -unknown sp. 9	825	Negril, Jamaika	HBOI 23-VIII-93-4-001
		?	<i>H</i> -unknown sp. 8	675	Hierro, Kanarische Inseln	HBOI 10-VI-91-1-001

## Fortsetzung B I Verzeichnis der Poriferen

Demospongiae

Subklasse	Ordnung	Familie	Spezies	Tiefe [m]	Lokalität	Code
Homoscleromorpha	Homosclerophorida	Plakinidae	<i>Plakortis</i> sp.	285	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 22J1-10
Tetractinomorpha	Astrophorida	Anocrinidae	<i>Stryphnus ponderosus</i>	285	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 22J1-4
			<i>Dragmastra normanii</i>	100-200	Korsfjord, Norwegen	aur 3-03
		Geodiidae	<i>Geodia barretti</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 02VIII99 30J1-1
			<i>Geodia macandrewii</i>	260	Sula Ridge, Norwegen	POS 30VII99 18J1-7
			<i>Isops phlegraei</i>	290	Sula Ridge, Norwegen	POS 01VIII99 26J1-2
			<i>Pachymatisma johnstonii</i>	100-200	Korsfjord, Norwegen	BRA-PJ
		Theneidae	<i>Thenea muricata</i>	270	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 24J2-6
	Hadromerida	Polymastiidae	<i>Tentorium semisuberites</i>	300	Sula Ridge, Norwegen	JH 1-4
Ceractinomorpha	Poecilosclerida	Microcomidae	<i>Antho dichotoma</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 02VIII99 30J1-8
			<i>Clathria barleei</i>	100-200	Korsfjord, Norwegen	BRA-CB
		Hymedesmiidae	<i>Hymedesmium</i> sp.	300	Sula Ridge, Norwegen	JH 1-5
		Myxillidae	<i>D</i> -unknown sp. 1	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 02VIII99 30J1-11a
			<i>D</i> -unknown sp. 2	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 02VIII99 30J1-11b
		Coelosphaeridae	<i>Forcepia forcipis</i>	290	Sula Ridge, Norwegen	POS 01VIII99 26J1-9
		Mycalidae	<i>Mycale lingua</i>	290	Sula Ridge, Norwegen	POS 01VIII99 26J1-3
	Haplosclerida	Phloeodictyidae	<i>Oceanapia robusta</i>	300	Sula Ridge, Norwegen	POS 01VIII99 28J2-5
		Chalimidae	<i>Haliclona</i> sp. 1	260	Sula Ridge, Norwegen	POS 30VII99 18J1-6
			<i>Haliclona</i> sp. 2	260	Sula Ridge, Norwegen	POS 30VII99 18J1-8
			<i>Haliclona urceolus</i>	100-200	Korsfjord, Norwegen	aur 3-08
		Petrosiidae	<i>Petrosia crassa</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 02VIII99 32J2-1
		Niphatidae	<i>Hemigellius pumiceus</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 02VIII99 32J2-2
	Halichondrida	Axinellidae	<i>Phakellia ventilabrum</i>	290	Sula Ridge, Norwegen	POS 30VII99 20J2-4
			<i>Phakellia robusta</i>	100-200	Korsfjord, Norwegen	aur 3-06
			<i>Phakellia (Axinella) rugosa</i>	100-200	Korsfjord, Norwegen	aur 3-08
			<i>Axinella infundibuliformis</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 30J1-13
		Halichondriidae	<i>Spongosorites genitrix</i>	270	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 24J2-7
			<i>Hymeniacion aff. fallax</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 30J1-5
	Dendroceratida	Darwinellidae	<i>Dendrilla cirsioides</i>	320	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 30J1-11
			<i>D</i> -unknown sp. 3	285	Sula Ridge, Norwegen	POS 31VII99 22J1-10b
		Dyctiodendrillidae	<i>D</i> -unknown sp. 4	100-200	Korsfjord, Norwegen	BRA-Ind. 5
		?	<i>D</i> -unknown sp. 5	285	Sula Ridge, Norwegen	POS 30VII99 20J2-15

**B II Verzeichnis der Bakterien**

Taxonomische Zuordnung Stand: Januar 2001

**Firmicutes**

<b>Bacilli</b>	<b>Ordnung</b>	<b>Stamm (nächster Verwandter)</b>	<b>Homologie- Abweichung [%]</b>
P MBA 215	Bacillales	<i>Bacillus firmus</i>	11,3

**Proteobakterien**

<b><math>\alpha</math>-Klasse</b>	<b>Ordnung</b>	<b>Stamm (nächster Verwandter)</b>	<b>Homologie- Abweichung [%]</b>
Hal MBA 17b Geo MBA 4/5.2.1		$\alpha$ -Proteobacterium sp. 1 $\alpha$ -Proteobacterium sp. 2	
Hal CSA 62ad	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas</i> sp.	0,0
Hal CSA 60		<i>Erythrobacter longus</i>	3,1
OR CSA 9		<i>Erythrobacter longus</i>	3,5
OR CSA 10		<i>Erythrobacter longus</i>	3,3
PS CSA 6		<i>Erythrobacter longus</i>	3,8
PS CSA 10		<i>Erythrobacter longus</i>	3,2
Hal MBA 18	Rhodobacterales	<i>Roseobacter algalicola</i>	3,4
ORS BMM 2		<i>Rhodobacter</i> sp.	5,0
ORS BMM 3		<i>Rhodobacter</i> sp.	4,0

## Fortsetzung B II Verzeichnis der Bakterien

**Proteobakterien**

$\gamma$ -Klasse	Ordnung	Stamm (nächster Verwandter)	Homologie- Abweichung [%]
Hal MBA 40 b <sub>0</sub>		$\gamma$ -Proteobacterium sp. 1	
Geo MBA 4/7.1		$\gamma$ -Proteobacterium sp. 1	
OR CDC 5	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i> sp.	5,6
OR CDC 2		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	7,6
Hal MBA 16		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5,4
Hal MBA 17a		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5,5
Hal MBA 43a		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5,5
P MBA 216h		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5,6
PS CSA 2		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	8,3
PS CSA 7		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	7,0
Geo MBA 3/7.1	Alteromonadales	<i>Alteromonas macleodii</i>	0,0
Hal MBA 11b		<i>Colwellia</i> sp.	6,4
Hal MBA 11c		<i>Colwellia</i> sp.	6,4
Hal MBA 44d		<i>Colwellia</i> sp.	6,0
Hal MBA 31		<i>Marinobacter</i> sp.	2,5
Geo MBA 1/1.1		<i>Marinobacter</i> sp.	3,3
P MBA 228w		<i>Marinobacter</i> sp.	6,2
Geo MBA 4/4.2.1		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	3,0
Hal MBA 19		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0,9
Hal MBA 20		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	3,2
Hal MBA 24		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	2,8
Geo MBA 2/5.3.1		<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	0,8
Geo MBA 4/6.1		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	2,0
Hal MBA 7		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	2,4
Hal MBA 8a		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	2,6
Hal MBA 9b <sub>1</sub>		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	1,7
Hal MBA 32		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	1,9
P MBA 229h		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	2,0
Ph MBA 142 d		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	0,0
Ph MBA 144cd		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	0,0
P MBA 223d		<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	0,0
Geo MBA 3/21.2.1		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	0,2
Geo MBA 4/8.1		<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	0,0
Geo 3/22.2.1	Vibrionales	<i>Vibrio splendidus</i>	2,5

### B III Ausgewählte, in der Literatur beschriebene schwammassoziierte Prokaryota

In der Tabelle wurde die höhere taxonomische Einheit eines Prokaryots gekennzeichnet, wenn bei Gensequenzanalysen Segmentähnlichkeiten einer Spezies < 95 % zum nächsten Verwandten bestimmt wurden oder Kürzel für nicht identifizierte Klone angegeben wurden. Mehrere in einer Publikation genannte Phylotypen eines Taxons oder taxonomisch nicht bestimmte Klone wurden ferner aus Gründen der Übersicht als Einzelnennung gewertet. Schwammassoziierte Cyanobacteria wurden in dieser Auflistung nicht berücksichtigt.

#### Schwammassoziierte Bacteria

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung/Spezies	Quelle
Chloroflexi	Chloroflexi	-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002
		Chloroflexales	Chloroflexacea	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b
Nitrospira	Nitrospira	-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002
Chlorobi	Chlorobia	-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b
		Chlorobiales	Chlorobiaceae	-	EIMHJELLEN, 1967
Proteobacteria	α-Proteo-bacteria	-	-	-	IMHOFF und TRÜPER, 1976
		-	-	-	SCHUMANN-KINDEL <i>et al.</i> , 1996
		-	-	-	SCHUMANN-KINDEL <i>et al.</i> , 1997
		-	-	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
		-	-	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999
		-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001
		-	-	-	WEBSTER und HILL, 2001
		-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002
		-	-	-	THOMS <i>et al.</i> , 2003
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
		Spingomonadales	Spingomonadaceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
		Spingomonadales	Spingomonadaceae	<i>Erythrobacter</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998	
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> sp.	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998	
	β-Proteo-bacteria	-	-	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
		-	-	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999
		-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b
		Burkholderiales	Alcaligenaceae	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999
		Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia cepacia</i>	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia cepacia</i>	THOMS <i>et al.</i> , 2003	
	γ-Proteo-bacteria	-	-	-	SCHUMANN-KINDEL <i>et al.</i> , 1996
		-	-	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998
		-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1999
		-	-	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999
		-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2001
		-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b
		-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002
		-	-	-	THOMS <i>et al.</i> , 2003
		Chromatiales	Chromatiaceae	-	EIMHJELLEN, 1967
		Chromatiales	Chromatiaceae	<i>Chromatium</i> sp.	IMHOFF und TRÜPER, 1976
		Chromatiales	Ectothiorhodospira.	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i>	IMHOFF und TRÜPER, 1976
		Thiothrichales	Thiotrichaceae	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999
Pseudomonadales		Pseudomonadaceae	-	SANTAVY und COLWELL, 1990	
Pseudomonadales		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JAYATILAKE <i>et al.</i> , 1996	
Pseudomonadales		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
Pseudomonadales		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.	BULTEL-PONCE <i>et al.</i> , 1999	
Pseudomonadales		Moraxellaceae	-	SANTAVY und COLWELL, 1990	
Alteromonadales		Alteromonadaceae	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
Alteromonadales		Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
Alteromonadales		Alteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	IVANOVA <i>et al.</i> , 1998b	
Alteromonadales		Alteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
Alteromonadales		Alteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	BURJA <i>et al.</i> , 1999	
Alteromonadales		Alteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001	
Alteromonadales	Alteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	IVANOVA <i>et al.</i> , 2002		

## Fortsetzung B III Ausgewählte, in der Literatur beschriebene schwammassoziierte Prokaryota

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung/Spezies	Quelle	
Proteobacteria	$\gamma$ -Proteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998	
		Vibrionales	Vibrionaceae	-	BURJA <i>et al.</i> , 1999	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio alginolyticus</i>	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> sp.	SANTAVY und COLWELL, 1990	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> sp.	SHIEH und LIN, 1994	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> sp.	SCHUMANN-KINDEL <i>et al.</i> , 1997	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> sp.	OCLARIT <i>et al.</i> , 1998	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> sp.	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001	
		Aeromonadales	Aeromonadaceae	-	BURJA <i>et al.</i> , 1999	
	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i> sp.	SANTAVY und COLWELL, 1990		
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-	BURJA <i>et al.</i> , 1999		
	$\delta$ -Proteobacteria	-	-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1999
		-	-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2001
		-	-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b
		-	-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002
		Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	-	SCHUMANN-KINDEL <i>et al.</i> , 1997	
		Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i> sp.	IMHOFF und TRÜPER, 1976	
		Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	-	SCHUMANN-KINDEL <i>et al.</i> , 1997	
Desulfuromonadales		Pelobacteraceae	-	SCHMIDT <i>et al.</i> , 2000		
Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998			
Firmicutes	-	-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1999	
	-	-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b	
	Clostridia	-	-	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	IVANOVA <i>et al.</i> , 1998b	
		Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
		Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001	
		Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus firmus</i>	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
Lactobacillales		Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i> sp.	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001		
Lactobacillales	Streptococcaceae	-	BURJA <i>et al.</i> , 1999			
Actinobacteria	Actinobacteria	-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1999	
		-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2001	
		-	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002	
		Actinomycetales	-	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
		Actinomycetales	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b	
		Actinomycetales	Micrococcaceae	-	SANTAVY und COLWELL, 1990	
		Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001	
		Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i>	BULTEL-PONCE <i>et al.</i> , 1998	
		Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.	STIERLE <i>et al.</i> , 1988	
		Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2001	
		Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999	
		Actinomycetales	Corynebacteriaceae	-	SANTAVY <i>et al.</i> , 1990	
Planctomycetes	Planctomycetacia	-	-	-	FUERST <i>et al.</i> , 1999	
		-	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2001	
		-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b	
		Planctomycetales	Planctomycetaceae	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1999	
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002	
Acidobacteria	Acidobacteria	-	-	-	THOMS <i>et al.</i> , 2003	
		Acidobacteriales	-	-	HENTSCHEL <i>et al.</i> , 2002	
		Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b	
Cytophaga – Flavobacterium – Bacteroidetes-Gruppe	-	-	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001b	
	Bacteroidetes	-	-	-	THOMS <i>et al.</i> , 2003	
		Bacterioidales	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 1999	
		Bacterioidales	-	-	FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2001	
	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998	
		Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	-	PEROVIC <i>et al.</i> , 1998	
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	-	ALTHOFF <i>et al.</i> , 1998	
Sphingobacteriales		Flexibacteraceae	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999		
Sphingobacteriales		Flexibacteraceae	<i>Cytophaga</i> sp.	LOPEZ <i>et al.</i> , 1999		



## Fortsetzung B III Ausgewählte, in der Literatur beschriebene schwammassoziierte Prokaryota

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung/Spezies	Quelle
		-	-	-	FUERST <i>et al.</i> , 1999
Eury-archaeota	Methanococci	Methanomicrobiales	-	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001a
Crenarchaeota	Thermoprotei	Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	-	WEBSTER <i>et al.</i> , 2001a
		Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	-	MARGOT <i>et al.</i> , 2002
		Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	PRESTON <i>et al.</i> , 1996
		Cenarchaeales	Cenarchaeaceae	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	SCHLEPER <i>et al.</i> , 1998

### B IV Ausgewählte Mikroorganismen mit relevanten Lipidbiomarkern

MAGE = Monoalkylglyceroletherlipide, FA = Fettsäure, DAGE = Dialkylglyceroletherlipide, DCA = Dicarbonsäuren, Plasmal. = Alkenyletherlipide, DiMe = Dimethylverzweigung

<b>Bakterium</b>	<b>Phylum-Klasse-Ordnung</b>	<b>Ökologie</b>	<b>Lipidbestandteile</b>	<b>Quelle</b>
<i>Affipia</i> sp.	Proteobacteria-Alphaproteobacteria-Rhizobiales	mesophil	11-Me-C <sub>18:1</sub> Δ <sup>6</sup> -FA	MOSS <i>et al.</i> , 1990; BRENNER <i>et al.</i> , 1991
<i>Ammonifex degensii</i>	Firmicutes-Clostridia-Thermoanaerobacteriales	hyperthermophil, strikt anaerob, autotroph	MAGE und DAGE (C <sub>14</sub> bis C <sub>18</sub> )	HUBER <i>et al.</i> , 1996
<i>Aquifex pyrophilus</i>	Aquificae-Aquificae-Aquificales	hyperthermophil, mikroaerophil, chemolithoautotroph	nichtisoprenoide MAGE (C <sub>18:1</sub> bis C <sub>21:1</sub> ), DAGE (C <sub>16</sub> bis C <sub>21:1</sub> )	HUBER <i>et al.</i> , 1992; JAHNKE <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Firmicutes-Bacilli-Bacillales	thermophil, acidophil	Bakteriohopanetetrol	LANGWORTHY und MAYBERRY, 1976
<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes-Bacilli-Bacillales	mesophil	C <sub>16:1</sub> Δ <sup>5</sup> -FA, Dime-FA	FULCO, 1967; CARBALLEIRA <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Bacteroidetes-Bacteroidetes-Bacteroidales	mesophil, anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Bacteroidetes-Bacteroidetes-Bacteroidales	mesophil, anaerob	Plasmal.	GOLDFINE und HAGEN, 1972
<i>Borrelia</i> sp.	Spirochaetes-Spirochaetes-Spirochaetales	anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Butyrivibrio</i> sp.	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	mesophil, anaerob	dimere Plasmal., estergebundene Dime-DCA	KLEIN <i>et al.</i> , 1979; CLARKE <i>et al.</i> , 1980
<i>Clostridium acetium</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	mesophil	Etherlipide (C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> )	GATTINGER <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Clostridium butyricum</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	mesophil	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969 GATTINGER <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium kaimantoi</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Clostridium keneboi</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Clostridium perfringens</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Clostridium thomohydrosulfuricum</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	thermophil, anaerob	MAGE, Plasmal.	LANGWORTHY und POND, 1986b
<i>Clostridium thermocellum</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	thermophil, anaerob	MAGE, Plasmal.	LANGWORTHY und POND, 1986b

## Fortsetzung B IV Ausgewählte Mikroorganismen mit relevanten Lipidbiomarkern

<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	thermophil, anaerob	MAGE, Plasmal.	LANGWORTHY und POND, 1986b
<i>Clostridium welchii</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales		Plasmal.	GOLDFINE und HAGEN, 1972
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales		10-Me-C <sub>18:1</sub> -FA, 10-Me-C <sub>18:0</sub> -FA	YAGÜE <i>et al.</i> , 2003
<i>Corynebacterium</i> sp.	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales		9-Me-C <sub>18:1</sub> Δ <sup>10</sup> -FA	NIEPEL <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfobacter</i> sp.	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfobacterales	anaerob	10-Me-C <sub>16:0</sub> -FA	TAYLOR und PARKES, 1983; DOWLING <i>et al.</i> , 1988; VAINSHTEIN <i>et al.</i> , 1992 u.a.
<i>Desulfococcus multivarians</i>	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfobacterales	mesophil, anaerob	<i>ai</i> -C <sub>15:0</sub> -FA	KOHRING <i>et al.</i> , 1994
<i>Desulforhabdus amnigenus</i>	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfobacterales	mesophil, anaerob	MAGE (C <sub>15</sub> bis C <sub>17</sub> )	RÜTTERS <i>et al.</i> , 2001
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Syntrophobacterales			
	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfobacterales	mesophil, anaerob	MAGE (C <sub>16</sub> ), <i>ai</i> -C <sub>15:0</sub> -FA	KOHRING <i>et al.</i> , 1994; RÜTTERS <i>et al.</i> , 2001
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	mesophil, anaerob	DCA	REZANKA <i>et al.</i> , 1990
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfovibrionales	mesophil, anaerob	<i>i</i> -C <sub>15:0</sub> -FA, <i>i</i> -C <sub>17:1</sub> Δ <sup>9</sup> -FA	BOON <i>et al.</i> , 1977; TAYLOR und PARKES, 1983; KOHRING <i>et al.</i> , 1994
<i>Desulfovibrio longus</i>	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfovibrionales	mesophil, anaerob	<i>ai</i> -C <sub>15:0</sub> -FA	KOHRING <i>et al.</i> , 1994
<i>Desulfovibrio</i> sp.	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Desulfovibrionales	mesophil, anaerob	Plasmal., <i>i</i> -C <sub>17:1</sub> Δ <sup>9</sup> -FA	KAMIO <i>et al.</i> , 1969; EDLUND <i>et al.</i> , 1985
<i>Erythrobacter longus</i>	Proteobacteria-Alpha-proteobacteria-Sphingomonadales		C <sub>18:2</sub> -FA	FUERST <i>et al.</i> , 1993
<i>Frankia</i> sp.	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales	autotroph	Hopanoide	ROSA-PUTRA <i>et al.</i> , 2001
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ( <i>Acetobacter xylinum</i> )	Proteobacteria-Alpha-proteobacteria-Rhodospirillales	aerob, chemoheterotroph	Bakteriohopanetetrol, 3-Methylhopanoide, Hop-17(21)-en	FORSTER <i>et al.</i> , 1973; ROHMER und OURISSON, 1976
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Proteobacteria-Alpha-proteobacteria-Rhizobiales		Neohop-13(18)-en	BISSERET <i>et al.</i> , 1985; ZUNDEL und ROHMER, 1985b
<i>Methylocaldium</i> sp.	Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Methylococcales		2-Methylhopanoide	CVEJIC <i>et al.</i> , 2000a
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Methylococcales	methylo-troph	3-Methylhopanoide	SUMMONS <i>et al.</i> , 1994

## Fortsetzung B IV Ausgewählte Mikroorganismen mit relevanten Lipidbiomarkern

<i>Mycobacterium</i> sp.	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales	aerob	10-Me-C <sub>18:0</sub> -FA, DiMe-FA	JULAK <i>et al.</i> , 1980; BRENNAN, 1988; LUQUIN <i>et al.</i> , 1991; SPRINGER <i>et al.</i> , 1995; CHOU <i>et al.</i> , 1996; TORKKO <i>et al.</i> , 1998
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Firmicutes-Mollicutes-Mycoplasmatales		MAGE (C <sub>16</sub> bis C <sub>18</sub> ), Plasmal (C <sub>16</sub> bis C <sub>18</sub> )	WAGNER <i>et al.</i> , 2000
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Proteobacteria-Betaproteobacteria-Nitrosomonadales	autotroph	Hopanoide	OURISSON <i>et al.</i> , 1979
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	Proteobacteria-Betaproteobacteria-Nitrosomonadales		11-Me-C <sub>16:0</sub> -FA, 10-Me-C <sub>17:0</sub> -FA, 11-Me-C <sub>18:0</sub> -FA	LIPSKI <i>et al.</i> , 2001
<i>Nocardopsis</i> sp.	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales		10-Me-C <sub>18:0</sub> -FA	CHUN <i>et al.</i> , 2000
<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Persephonella</i> sp.	Aquificae-Aquificae-Aquificales	thermophil, mikroaerophil, chemolithoautotroph	MAGE (C <sub>20:1</sub> , C <sub>20:0</sub> )	GÖTZ <i>et al.</i> , 2002
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales	anaerob	Plasmal	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Pseudomonas nautica</i>	Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Pseudomonadales	psychrophil, fakultativ anaerob	10-Me-C <sub>16:0</sub> -FA	DOUMENO <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Pseudomonadales		11-Me-C <sub>18:1</sub> Δ <sup>7</sup> -FA	BARNES <i>et al.</i> , 1989
<i>Rhizobium</i> sp.	Proteobacteria-Alphaproteobacteria-Rhizobiales		11-Me-C <sub>18:1</sub> Δ <sup>7</sup> -FA	GERSON <i>et al.</i> , 1974; ORGAMBIDE <i>et al.</i> , 1993
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal	GOLDFINE und HAGEN, 1972
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales	aerob	10,15-DiMe-C <sub>16:0</sub> -FA	EMBLEY <i>et al.</i> , 1987
<i>Sarcina ventriculi</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	mesophil, anaerob	DCA	JUNG <i>et al.</i> , 1993
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Sphingomonas echinoides</i>	Proteobacteria-Alphaproteobacteria-Sphingomonadales	mesophil	11-Me-C <sub>18:1</sub> Δ <sup>7</sup> -FA	ROWE <i>et al.</i> , 2000
<i>Stigmatella aurantiaca</i>	Proteobacteria-Deltaproteobacteria-Myxococcales		DAGE	ASSELINEAU und ASSELINEAU, 1989
<i>Streptococcus mutans</i>	Firmicutes-Bacilli-Lactobacillales		MAGE (C <sub>12</sub> )	BRISSETTE <i>et al.</i> , 1986
<i>Streptomyces</i> sp.	Actinobacteria-Actinobacteria-Actinomycetales		10-Me-C <sub>16:0</sub> -FA, 10-Me-C <sub>17:0</sub> -FA, 10-Me-C <sub>18:0</sub> -FA	BROWN <i>et al.</i> , 1985

## Fortsetzung B IV Ausgewählte Mikroorganismen mit relevanten Lipidbiomarkern

<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Firmicutes-Clostridia-Thermoanaerobacteriales	thermophil	DCA	JUNG <i>et al.</i> , 1994
<i>Thermoanaerobacter thermohydro sulfuricum</i>	Firmicutes-Clostridia-Thermoanaerobacteriales	thermophil	DCA	LANGWORTHY und POND, 1986b
<i>Thermoanaerobacter thermo sulfurigenes</i>	Firmicutes-Clostridia-Thermoanaerobacteriales	thermophil	DCA	LANGWORTHY und POND, 1986b
<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	Thermodesulfobacteria-Thermodesulfobacteriales	thermophil, anaerob	MAGE (C <sub>16</sub> bis C <sub>19</sub> ), DAGE (C <sub>16</sub> bis C <sub>18</sub> )	LANGWORTHY <i>et al.</i> , 1983
<i>Thermomicrobium roseum</i>	Thermomicrobia-Thermomicrobia-Thermomicrobiales	thermophil, aerob, heterotroph	10-Me-C <sub>16:0</sub> -FA, 12-Me-C <sub>18:0</sub> -FA, 7,11-DiMe-C <sub>17:0</sub>	POND <i>et al.</i> , 1986
<i>Thermotoga maritima</i>	Thermotogae-Thermotogae-Thermotogales	hyperthermophil, anaerob	DCA (C <sub>30</sub> bis C <sub>34</sub> ), MAGE (C <sub>32</sub> )	HUBER <i>et al.</i> , 1986; DE ROSA <i>et al.</i> , 1988; CARBALLERA <i>et al.</i> , 1997b
<i>Veillonella gazogenes</i>	Firmicutes-Clostridia-Clostridiales	anaerob	Plasmal.	KAMIO <i>et al.</i> , 1969
<i>Vibrio cholerae</i>	Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Vibrionales		11-Me-C <sub>19:1</sub> -FA	GUCKERT <i>et al.</i> , 1986

PME = 2,6,10,15,19-Pentamethylheicosan

<i>Archaeum</i>	Phylum-Klasse-Ordnung	Ökologie	Lipidbestandteile	Quelle
<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	Crenarchaeota-Thermoprotei-Cenarchaeales	mesophil	acyclische und intern cyclisierte Biphtane	PRESTON <i>et al.</i> , 1996; DELONG <i>et al.</i> , 1998
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Euryarchaeota-Methanobacteriales		PME $\Delta$ <sup>1-2</sup>	HOLZER <i>et al.</i> , 1979; TORNABENE <i>et al.</i> , 1979
<i>Methanobolus bombayensis</i>	Euryarchaeota-Methanococci-Methanosarcinales	anaerob	PME $\Delta$ <sup>3-5</sup>	SCHOUTEN <i>et al.</i> , 1997
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Euryarchaeota-Methanococci-Methanosarcinales	anaerob	PME $\Delta$ <sup>1-4</sup>	HOLZER <i>et al.</i> , 1979; TORNABENE <i>et al.</i> , 1979
<i>Methanosarcina mazei</i>	Euryarchaeota-Methanococci-Methanosarcinales	anaerob	PME $\Delta$ <sup>3-5</sup>	SCHOUTEN <i>et al.</i> , 1997
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Euryarchaeota-Thermococci-Thermococcales	hyperthermophil, anaerob,	DCA (C <sub>16</sub> bis C <sub>22</sub> )	STETTER <i>et al.</i> , 1990; CARBALLERA <i>et al.</i> , 1997b
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Crenarchaeota-Thermoprotei-Sulfolobales	hyperthermophil, aerob	acyclische und intern cyclisierte Biphtane	DE ROSA <i>et al.</i> , 1983; DE ROSA und GAMBACORTA, 1988

## C I Hydrochemie

Während der Forschungsreise POS 254 (24.07.–06.08.1999) wurden die ozeanographischen und meereschemischen Bedingungen am Sula-Rücken (um 64:05'N, 08:00'E) untersucht. An acht Stationen (Tabelle C1) nahe des Kaltwasserriffkomplexes wurden Salinität/Temperatur-Profile mit einer Multisonde (Seabird SBE 9 CTD) in der Wassersäule aufgenommen und simultan 69 Wasserproben (Kranzwasserschöpfer mit 5L-Niskin-Flaschen) aus verschiedenen Wassertiefen (ca. 5–345 m, überwiegend unter 200 m) entnommen. Weiterhin wurden vier bodennahe Wasserproben bei Tauchgängen mit dem bemannten Tauchboot ‚JAGO‘ im zentralen Riffbereich mit einer 5L-Niskin-Flasche gewonnen. Folgende hydrochemische Basisparameter der Wasserproben wurden bestimmt: pH, gelöster anorganischer und organischer Kohlenstoff (DIC, DOC), Nährstoffe, Sauerstoff und Methan. Die jeweiligen Messwerte der Proben sind in Tabelle D1 zusammengestellt.

**Tabelle C1** Lokationen und Zeitpunkte der CTD-Stationen am Sula-Rücken im Sommer 1999 (MS = Multisonde, JA = Tauchboot ‚JAGO‘)

Station	Latitude	Longitude	max. Wassertiefe [m]	pH	DIC	DOC	Nährstoffe	O <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>
01 MS	64:04:25N	08:01:50E	325	X	X				
05 MS	64:05:00N	08:04:00E	332	X	X	X	X	X	X
16 MS	64:06:00N	08:03:00E	294	X	X	X	X	X	
18 JA	64:05:90N	08:05:40E	286		X	X	X		X
19 MS	64:05:90N	08:05:40E	286	X	X	X	X	X	X
20 JA	64:05:87N	08:05:43E	285	X	X	X	X		X
23 MS	64:05:07N	08:06:50E	357	X	X	X	X	X	X
27 MS	64:04:25N	08:01:60E	322	X	X	X	X	X	X
30 JA	64:07:80N	08:09:80E	318	X	X	X	X		X
31 MS	64:07:50N	08:09:50E	304	X	X	X	X	X	X
32 JA	64:08:10N	08:10:52E	325		X	X	X		X
34 MS	64:03:20N	07:57:40E	273	X	X	X	X	X	X

X = Stationen, an denen Wasserproben für die jeweiligen Analysen entnommen wurden.

Im Folgenden werden die analytischen Verfahren beschrieben.

### I.1 pH

Die pH-Messungen wurden an Bord mit einem Schott-pH-Meter (CG 841), das mit einer Ag/AgCl-Messelektrode, einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und einem Temperaturfühler gekoppelt war, durchgeführt. Die Elektroden wurden täglich mit NBS-Pufferlösungen (pH 4,00 und 7,00, MERCK) kalibriert. Die Messdaten wurden in ihre *in-situ*-pH-Werte umgerechnet.

### I.2 Nährstoffe

Wasserproben für die Analyse ausgewählter Nährstoffe und der DOC (dissolved organic carbon)-Konzentrationen wurden über Glasmikrofaserfilter (Whatman GF/F, 35mm) filtriert. Für die Nährstoffanalyse vorgesehene Unterproben des Filtrats wurden mit HgCl<sub>2</sub> versetzt und bis zur Vermessung bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Nährstoffe Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), Phosphat (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), Silikat (Si(OH)<sub>4</sub>) und Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) wurde am Institut für Organische Chemie, Abteilung für Organo-Meereschemie, der Universität Hamburg mit einem Auto Analyzer 2, Technicon durchgeführt.

### I. 3 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Aliquots des o.g. Filtrats für die Bestimmung der DOC-Konzentrationen wurden zur Umsetzung anorganisch gebundenen Kohlenstoffs zu  $\text{CO}_2$  mit 50%iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf  $\text{pH} < 2$  angesäuert und bis zur Analyse in 20mL-Glasampullen verschweißt.

Die DOC-Konzentrationen wurden im Labor mit einem automatisierten Dimatec®-System (DIMA-TOC 100) bestimmt.  $\text{CO}_2$ , das aus der Umsetzung anorganisch gebundenen Kohlenstoff resultiert, wird vor der Analyse mit Hilfe eines  $\text{N}_2$ -Stroms entfernt. Nachfolgend wird organisch gebundener Kohlenstoff aus 10  $\mu\text{L}$  Probe durch katalytische Hochtemperatur-Oxidation (850 °C, Platin-Katalysator) quantitativ in  $\text{CO}_2$  überführt. Der Gehalt des  $\text{CO}_2$  im getrockneten Gasstrom wird mit einem Infrarotdetektor bestimmt. Die Signale wurden mit der ChromStar-Software (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, V. 3.10) aufgezeichnet. Die Quantifizierung erfolgte durch Peakflächenintegration der Signale und Vergleich mit Standardlösungen ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) bekannter Konzentrationen. Die Präzision der Messapparatur wurde auf  $\pm 14,2 \text{ ng C L}^{-1}$  bestimmt.

### I. 4 Gelöster anorganischer Kohlenstoff (DIC)

Wasserproben für die Bestimmung der DIC-Konzentrationen wurden mit  $\text{HgCl}_2$  versetzt und bis zur Analyse luftdicht gelagert. DIC-Konzentrationen wurden coulometrisch (U.I.C. Inc., USA, model 5011) nach der Methode von JOHNSON *et al.* (1985), JOHNSON und SIEBURTH (1987), JOHNSON *et al.* (1993) und DOE (1994) bestimmt. Ein definiertes Probenvolumen wird dabei mit einer 8,5%igen  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung zur Überführung von  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  in  $\text{CO}_2$  versetzt und mit einem  $\text{N}_2$ -Strom entgast. Der Gasstrom wird getrocknet und in eine Titrationszelle geleitet, in der  $\text{CO}_2$  mit Monoethanolamin zu Hydroxyethylcarbaminsäure überführt wird. Ein pH-Indikator (Thymolphthalein) reagiert auf die Ansäuerung mit Farbänderung und Erhöhung der optischen Transmission. Änderungen der Transmission der Lösung führen zur Aktivierung eines elektrischen Zellstroms, der durch Elektrolyse des Wassers zur Bildung von  $\text{OH}^-$ -Ionen führt, bis die Transmission auf den Ausgangswert eingestellt ist (Neutralisation). Die verbrauchte Ladungsmenge ist proportional zur  $\text{CO}_2$ -Konzentration der Wasserprobe. Die Messwerte der analysierten Proben wurden anschließend auf konstante Salinität (35,00) normiert. Zur Kalibrierung des Systems (Präzision  $\pm 3 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) wurden Seewasserproben zertifizierter  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (A. Dickson, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA) eingesetzt.

### I. 5 Methan

Die Proben für die Bestimmung gelösten Methans wurden bis zur Analyse in gasdichten 250mL-Glasflaschen bei 4° C gelagert. Zur Konservierung flüchtiger KW wurden etwa 8 g NaOH zugesetzt (N. Iversen, pers. Mitt.).  $\text{CH}_4$ -Konzentrationen wurden im Labor nach der Methode von SWINNERTON und LINNENBOM (1967) in modifizierter Form bestimmt (LADAGE *et al.*, 1991). Für das apparative Verfahren wurde ein ‚Purge und Trap‘-System eingesetzt.

1) 200 mL der Wasserprobe werden mittels eines He-Trägergasstroms in ein Purgegefäß überführt, in dem die Probe mit He 30 min entgast wird. Der getrocknete Gasstrom wird durch eine mit Aktivkohle gefüllte Kühlfalle (-80°C) geleitet, in der  $\text{CH}_4$  adsorbiert wird. Durch Aufheizen der Falle auf 80°C wird das  $\text{CH}_4$  desorbiert und anschließend mit dem Trägergasstrom in die gaschromatographische Analyseeinheit überführt.

2) Ein Gaschromatograph (CARLO ERBA, GC 6000) mit einer PLOT-Säule (Edelstahl, 3 m Länge, aktiviertes  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) und einem Flammenionisationsdetektor (FID) wurde zur chromatogra-

phischen Trennung und Bestimmung des CH<sub>4</sub> eingesetzt. Die GC-Ofentemperatur wurde isotherm bei 140°C gehalten und als Trägergas He eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,05 nL L<sup>-1</sup> und der lineare Messbereich bei 40 nmol L<sup>-1</sup>. Die Präzision des Systems wird mit 5 % des Messwertes angegeben.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der ChromStar-Software (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, V. 3.10) durch Peakflächenintegration und Vergleich mit Standardgasgemischen (Linde CH<sub>4</sub>; Messer Gas Mixture N 19) bekannter Konzentration.

## I. 6 Gelöster Sauerstoff

Die Konzentration gelösten Sauerstoffs in Wasserproben wurden an Bord nach der Methode von Winkler (GRASSHOFF, 1983) bestimmt. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Autotitrators (METROHM Titroprozessor 686), der vom Institut für Organische Chemie, Abteilung für Organomeereschemie, der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Das System wurde täglich mit Standardlösungen (KI, KIO<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kalibriert.

## C II Lipidchemie

### II.1 Probenvorbereitung

Die Lokalisationen und Beprobungsmethoden der Poriferen sowie die Herkunft des Prokaryoten-Zellmaterials sind in Kapitel 3 und im Anhang B1 dargestellt. Während die Proben des *HBOI* lyophilisiert bereitgestellt wurden, wurden die Poriferen vom Sula-Rücken und aus dem Korsfjord sofort nach der Bergung bei -20°C bis zur Aufbereitung gelagert. Die Gewebestücke wurden, wenn möglich, aus dem Inneren des Schwammkörpers entnommen. Bei vergleichsweise gering dimensionierten Schwämmen wurden auch äußere Gewebestücke, die zur Entfernung von Fremdpartikeln ausgiebig mit H<sub>2</sub>O gespült wurden, in die Aufbereitung einbezogen. Das Zellmaterial der Bakterien- und Archaeenisolat wurden vor der Extraktion lyophilisiert.

Für die Analyse von Membranlipiden wurde das Probenmaterial zunächst extrahiert oder direkt hydrolysiert. Für spezifische Fragestellungen, die aufwändige Aufbereitungsmethoden erforderten, wurden eine Auswahl an Porifera-Spezies untersucht.

Um organische Kontaminationen bei der Probenaufbereitung zu vermeiden, wurden ausnahmslos Chemikalien und organische Lösungsmittel hoher Reinheit (pro Analyti bzw. HPLC-Grade) sowie deionisiertes (MilliQ) und gegen organische Lösungsmittel extrahiertes Wasser verwendet. Sämtliche Behälter, Laborwerkzeuge und -geschirre aus Glas oder Metall wurden vor der Benutzung mit deionisiertem Wasser und Aceton gespült. Einwegpipetten und Seesand sowie ausgewählte Glasbehälter wurden 5 h auf 500°C erhitzt. Watte wurde in einer Soxhlet-Apparatur mit den üblichen Lösungsmitteln extrahiert.

### II.2 Allgemeine Aufbereitungsverfahren

#### II.2.1 Extraktion von Lipiden – Fraktionierung des organischen Gesamtexttraktes

Die Extraktion von Lipiden wurde nach der Methode von BLIGH und DYER (1959) in modifizierter Form durchgeführt.

Das Probenmaterial (Poriferen: 2–4 g Trockengewicht; Bakterien: 3–5 mg Trockengewicht) wurde mehrfach mit Methanol (MeOH)/Dichlormethan (DCM) (1:1, v/v) überschichtet und 10 min mit



Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand abgezogen, die organischen Extrakte vereinigt und *in vacuo* eingeeengt. Der Rückstand wurde bis zur Farblosigkeit des Lösungsmittels, mindestens jedoch fünffach extrahiert.

### Fraktionierung

Das meist komplexe Inventar des organischen Gesamtextraktes wurde in den überwiegenden Fällen säulenchromatographisch in Fraktionen verschiedener Polarität aufgetrennt (KW, Alkohole und Ketone, Säuren).

Der Extrakt wurde auf 0,5 g Kieselgel (MERCK Kieselgel 60, Korngröße 0,063–0,200 mm) getrocknet und in eine mit 4,5 g Kieselgel 60 gefüllte Glassäule (150 mm x 15 mm ID) gegeben. Entsprechend ihrer Polarität wurden die Inhaltsstoffe des Extrakts nacheinander mit *n*-Hexan (KW), einem Gemisch aus DCM/Essigsäureethylester (EE) (3:1, v/v) (Alkohole und Ketone) und einem Gemisch aus DCM/MeOH (3:2, v/v) (Carbonsäuren) eluiert.

### II.2.2 Hydrolyseverfahren

Höhermolekulare Membranlipide (> etwa 600 atomare Masseneinheiten, amu) müssen in ihre Teilstrukturen zerlegt werden, um diese den angewandten Analysemethoden zugänglich zu machen. Es ist bekannt, dass die in Membranlipiden häufig auftretenden Bindungsformen (hier Esterbindungen, Etherbindungen oder *vicinale* diol-Bindungen) verschieden empfindlich gegenüber unterschiedlichen Hydrolysemethoden sind. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene Reagenzien zur sauren oder alkalischen Hydrolyse jeweiliger Bindungsformen eingesetzt.

#### Saure Hydrolyse von Esterbindungen und Methylveresterung mit Trimethylchlorosilan (TMCS) – Fraktionierung des organischen Extraktes

Zur Überführung freier und estergebundener Fettsäuren (FA) in ihre freien ME-Derivate (FAME) wurde das Probenmaterial bzw. der getrocknete Lipidextrakt sauer hydrolysiert und (trans)verestert.

Die Probe wurde mit einem Gemisch aus TMCS in MeOH (1:8, v/v) versetzt und 1 h auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit 1 mL H<sub>2</sub>O und 1 mL *n*-Hexan überschichtet und für etwa 10 min mit Ultraschall behandelt. Die *n*-Hexan-Phase wurde abpipettiert und die Reaktionslösung mehrfach mit *n*-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend flüssigchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Nicht vom Kieselgel eluierbare Verbindungen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

### Fraktionierung

Nach der sauren Hydrolyse mit TMCS beinhaltet der Extrakt in vielen Fällen ein komplexes Gemisch organischer Inhaltsstoffe, die an käuflichen Normalphasen-Kartuschen (Supelclean™ LC-NH<sub>2</sub>; Supelco, Gelbett 500 mg, Fassungsvermögen 3 ml) aufgetrennt wurden.

Der stark in *n*-Hexan konzentrierte Extrakt wurde auf das Adsorbens aufgetragen und die Komponenten gemäß ihrer Polarität sukzessive mit *n*-Hexan (KW), einem Gemisch aus *n*-Hexan/DCM (3:1, v/v) (Ketone und FAME) und einem Gemisch aus DCM/Aceton (9:1, v/v) (Alkohole) eluiert.

### Alkalische Hydrolyse von Esterbindungen – Fraktionierung

Der getrocknete organische Gesamtextrakt bzw. das Probenmaterial wurde zur alkalischen Hydrolyse von Esterbindungen in einer Lösung aus KOH in MeOH (6 %) aufgenommen und 2 h bei 80°C mit Ultraschall behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurde die organische Phase abgenommen. Der Rückstand wurde mehrfach mit DCM bis zur Farblosigkeit des Lösungsmittels extrahiert und alle organischen Phasen vereinigt.

### Fraktionierung alkalisch hydrolysierter Lipide

Zu den vereinigten organischen Phasen wurden etwa gleiche Mengen H<sub>2</sub>O und DCM zugegeben, bis eine Phasentrennung erkennbar war. Die DCM-Phase enthielt die Neutrallipide wie KW, Alkohole, Dialkylglyceroldiether- und Dialkyldiglyceroltetraetherlipide und wurde entfernt. Die wässrige Phase wurde mit konz. HCl auf pH 1–2 angesäuert und nachfolgend mit DCM extrahiert. Die DCM-Phase enthielt die Fettsäuren.

### Fraktionierung alkalisch hydrolysierter Neutrallipide

Die alkalisch hydrolysierten Neutrallipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) an Kieselgel 60 (MERCK, DC-Glasplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 cm, Konzentrierungszone 20 x 2,5 cm) fraktioniert. Als mobile Phase wurde DCM eingesetzt. Auf der Basis empirisch ermittelter R<sub>F</sub>-Werte von käuflichen Standardsubstanzen (Hexadec-1-en, Hexadecan-1-ol, Cholesterol, Lanosterol) wurden drei Kieselgelbanden (= Fraktionen) isoliert (Tabelle C2).

**Tabelle C2** R<sub>F</sub>-Bereiche der aus Neutrallipiden gewonnenen Fraktionen

R <sub>F</sub> -Bereich	Substanzklasse(n)
> 0,35 bis 1,00	Kohlenwasserstoffe
> 0,10 bis 0,35	Alkohole, Glyceroldietherlipide
0,00 bis 0,10	Diglyceroltetraetherlipide

Zur Elution der Komponenten wurde das Kieselgel der Fraktionen in eine Glassäule überführt und mit *n*-Hexan, DCM oder MeOH im Überschuss gespült. Die Fraktionen wurden *in vacuo* eingengt.

### Saure Hydrolyse von Etherbindungen mit Iodwasserstoff (HI)

Die Analyse von Bestandteilen höhermolekularer Etherlipide wurde nach Spaltung der Etherbindungen unter stark acidischen Bedingungen durchgeführt. Etherbindungen in der Fraktion polarer Neutrallipide, die u.a. Dialkylglyceroltetraetherlipide beinhaltet, wurden nach der Methode von Kates (1965) in modifizierter Form oxidativ hydrolysiert.

Die Fraktion wurde unter einem N<sub>2</sub>-Strom vom Lösungsmittel befreit, mit 200 µL HI (57 % in H<sub>2</sub>O) und wenigen Tropfen Essigsäure versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 4 h auf 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde *n*-Hexan zugegeben und überschüssiges Jod durch Flüssig/Flüssig-Extraktion mit einer Natriumthiosulfat-Lösung (5 % in H<sub>2</sub>O) entfernt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreifach mit *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter einem N<sub>2</sub>-Strom vom Lösungsmittel befreit.

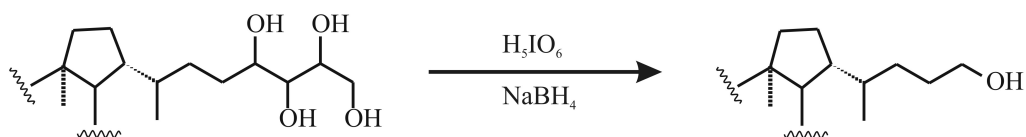
### Reduktion der Alkyliodide zu Kohlenwasserstoffen

Unter Argon wurde der Fraktion eine Suspension aus etwa 50 mg  $\text{LiAlH}_4$  in wasserfreiem Tetrahydrofuran zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Rückfluss 2 h auf  $75^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde langsam  $\text{H}_2\text{O}$  zugetropft, bis sich die Gasentwicklung einstellt. Die Reaktionslösung wurde dreifach mit *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und auf Kieselgel chromatographiert.

### Hydrolyse von cis-1,2-diolen (hier Hopanpolyole) mit Periodsäure ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ )

Aufgrund ihres unpolaren KW-Skeletts und ihrer überwiegend funktionalisierten Alkylreste sind die meisten Hopanoide amphipathische Verbindungen. Insbesondere für komplexe Hopanoide mit mehreren Alkoholgruppen, den Hopanpolyolen (s. Kapitel 5.4), ist die GC-Analyse mit herkömmlichen Verfahren erschwert, so dass für die Untersuchung dieser Komponenten besondere Degradationsmethoden erforderlich sind.

Mit Periodsäure werden C-C-Bindungen zwischen benachbarten Hydroxylgruppen (*vic*-diolen) selektiv gespalten (modifiziert nach FÖRSTER *et al.* (1973) und ROHMER *et al.* (1984); Abb. C1). Komponenten, die keine Teilstrukturen mit *vicinalen* OH-Gruppen besitzen, werden bei dieser Behandlung nicht umgesetzt.



**Abbildung C1** Schema der Spaltung von C-C-Bindungen mit  $\text{H}_5\text{IO}_6/\text{NaBH}_4$  am Beispiel eines Hopanpolyols mit *vicinalen* OH-Gruppen.

Der getrocknete Extrakt wurde mit einer Lösung aus Periodsäure (300 mg) in Tetrahydrofuran (THF)/Wasser (3 mL, 8:1 v/v) versetzt und 2 h bei RT verrührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mehrfach mit *n*-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingengt, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter einem  $\text{N}_2$ -Strom vom Lösungsmittel befreit.

### Reduktion der Aldehyde zu ihren primären Alkoholen

Der Extrakt wurde in einer Lösung aus  $\text{NaBH}_4$  (800 mg) in Ethanol (EtOH, 20 mL) aufgenommen und 12 h bei RT verrührt. Anschließend wurde langsam eine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (0,1 M) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend dreifach mit *n*-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt und mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

Die Methode wurde durch die parallele Aufbereitung von Zellmaterial des Hopanoide tragenden *Gluconacetobacter xylinus* überprüft. Zur langfristigen Lagerung wurden die gebildeten Alkohole in ihre Acetate überführt (s. Acetylierung).

### II.2.3 Derivatisierungsmethoden

Derivatisierungen individueller Substanzklassen wurden im Allgemeinen durchgeführt, um durch Minderung der Polarität eine optimale gaschromatographische Trennung oder eine aussagekräftige MS-Fragmentierung der Einzelkomponenten zu erzielen.

#### Methylveresterung freier Carbonsäuren mit Diazomethan

Freie Carbonsäuren werden (neben der Behandlung mit TMCS) mit Diazomethan in ihre ME überführt.

Zu der getrockneten Fraktion wurden 100 bis 200  $\mu\text{L}$  einer frisch zubereiteten Lösung von Diazomethan in Diethylether ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) zugegeben und bei RT für 1 h stehen gelassen. Nach erneuter Trocknung unter einem  $\text{N}_2$ -Strom wurde der Extrakt in DCM aufgenommen und flüssigchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt.

#### Trimethylsilylveretherung freier Alkohole mit *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)

Als rasche Methode zur Derivatisierung freier Alkohole wurde ihre Umsetzung zu Trimethylsilylether-Derivaten mittels BSTFA angewandt. Im Allgemeinen sind Trimethylsilylether-Derivate von Alkoholen nur vergleichsweise kurze Zeiträume stabil.

200  $\mu\text{L}$  BSTFA wurden zu dem getrockneten Extrakt gegeben und 2 h bei  $80^\circ\text{C}$  zur Reaktion gebracht. Mit einem  $\text{N}_2$ -Strom wurde der Extrakt vom Lösungsmittel befreit und in *n*-Hexan aufgenommen.

#### Acetylierung freier Alkohole mit Acetanhydrid

Acetate sind vergleichsweise langfristig stabile Derivate freier Alkohole.

Das trockene Edukt wurde in 1 ml EtOH aufgenommen und mit 1 ml Pyridin sowie 800  $\mu\text{l}$  Acetanhydrid versetzt. Nach der Reaktion (12 h, RT) wurde 2M HCl zugetropft (pH1–2) und wiederholt mit *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und an  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

#### Addition von Dimethyldisulfid (DMDS) an einfach ungesättigte FAME

Hinsichtlich ähnlicher MS-Fragmentierungsmuster der Isomere von monoen-FAME aufgrund von McLafferty-Umlagerungen ist die direkte Bestimmung der Position von Doppelbindungen ( $\Delta$ -Position) in diesen Komponenten erschwert. Zur massenspektrometrischen Lokalisierung von Doppelbindungen – bevorzugt von nieder- bis mittelmolekularen monoen-FAME – wurden diese nach der Methode von BUSER *et al.* (1983) in ihre Dimethyldisulfid-Addukte konvertiert. Der bevorzugte Zerfall der DMDS-Addukte, der exemplarisch in Abb. C2 gezeigt ist, führt zu indikativen Fragmenten bei der MS-Analyse. Die Lokalisierung der  $\Delta$ -Positionen zweifach ungesättigter FAME erfolgte mit Hilfe der von VINCENTI *et al.* (1987) publizierten Fragmentierungen.

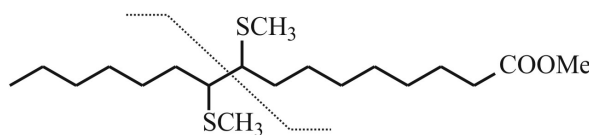


Abbildung C2 Fragmentierungsschema des Hexadec-9-ensäureME als DMDS-Addukt.

Die getrocknete Fraktion wurde in 200  $\mu\text{L}$  *n*-Hexan aufgenommen und 200  $\mu\text{L}$  DMDS sowie 40  $\mu\text{L}$   $\text{I}_2$ -Lösung (60 mg in 1 ml Diethylether) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h auf 50°C erhitzt. Nachfolgend wurden 200  $\mu\text{L}$  *n*-Hexan zugegeben und das Jod durch Flüssig/Flüssig-Extraktion mit einer Natriumthiosulfat-Lösung (5 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ) aus der organischen Phase entfernt. Die *n*-Hexan-Phase wurde abgezogen und die wässrige Phase dreifach mit *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und flüssigchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Zur quantitativen Entfernung schwefelhaltiger Verbindungen wurde der organischen Phase elementares Kupfer zugegeben.

Aufgrund einer vergleichsweise starken Molekülvergrößerung und Polaritätszunahme sowie verschiedener Additionsmechanismen in Abhängigkeit von der Distanz zweier Doppelbindungen bei mehrfach ungesättigten Verbindungen ist die GC-MS-Analyse mehrfach ungesättigter Komponenten erschwert. Deshalb ist die DMDS-Addition vorrangig zur Untersuchung von monoen-FAME geeignet.

### Derivatisierung polyungesättigter FAME mit Pyrrolidin

Zur Bestimmung der  $\Delta$ -Positionen mehrfach ungesättigter FAME wurden diese als *N*-acyl-Pyrrolidide nach der Methode von WALKUP *et al.* (1981) bzw. LANKELMA *et al.* (1983) untersucht. Bei diesem Verfahren findet die Derivatisierung des Moleküls an der funktionellen Gruppe statt. Die Addition des Pyrrolidins führt zu charakteristischen MS-Fragmentierungen der Produkte nach dem folgenden Schema (Abb. C3).

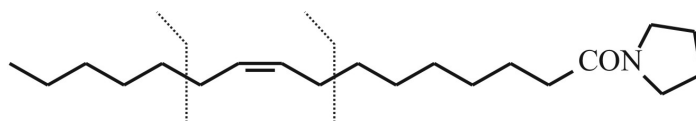


Abbildung C3 Fragmentierungsschema des *N*-hexadec-9-enoyl-Pyrrolidins.

Die getrocknete Fraktion wurde mit 200  $\mu\text{L}$  Pyrrolidin/Essigsäure (10:1, v/v) versetzt und 1 h auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde zu der Reaktionslösung 1 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  und etwas HCl (5 %) zugegeben und, nach guter Durchmischung, die organische Phase abgezogen. Dieser Schritt wurde dreifach durchgeführt und die vereinigten  $\text{Et}_2\text{O}$ -Phasen mehrfach mit  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nachfolgend unter  $\text{N}_2$  bis zur Trockene eingengt, die Komponenten in etwa 5 ml *n*-Hexan/ $\text{Et}_2\text{O}$  (1:4, v/v) gelöst und anschließend an  $\text{SiO}_2$  aufgereinigt.

### Hydrierung ungesättigter Verbindungen

Die Hydrierung führt zur Überführung ungesättigter Komponenten in ihre gesättigten Homologe und dient der Differenzierung zwischen Ringe enthaltenden Komponenten und Verbindungen mit aliphatischen Doppelbindungen.

Die in wenig *n*-Hexan gelöste Probe wurde mit wenigen Spatelspitzen Katalysator (Pd auf Aktivkohle) versetzt und anschließend 1 h bei RT unter ca. 2 bar  $\text{H}_2$ -Atmosphäre zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die Fraktion über Kieselgel gereinigt und unter einem  $\text{N}_2$ -Strom aufkonzentriert.

## II.3 Spezielle Aufbereitungsverfahren

### II.3.1 Aufbereitung der Fettsäuren aus Bakterien

Vorversuche an gesamtorganischen Extrakten der Bakterienreinkulturen zeigten, dass ungebundene Komponenten nur in Spurenkonzentrationen im Zellmaterial vorliegen (für fünf Stämme dreier Pseudoalteromonas-Spezies wurde ein Anteil von 1,0 bis 3,9 Gew.-% ungebundener FA am Inventar freier und estergebundener FA festgestellt). Aus diesem Grund konnten oftmals für freie Komponenten in den mengenmäßig begrenzt zur Verfügung stehenden Isolaten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Bei einem Vergleich des Inventars freier und estergebundener FA ausgewählter Bakterienisolate wurde des Weiteren beobachtet, dass diese qualitativ und quantitativ analoge Verteilungsmuster aufweisen. Qualitativ nahezu übereinstimmende Zusammensetzungen des Inventars freier und veresterter FA wurden ebenfalls von NICHOLS *et al.* (1997) in einem Angehörigen der Alteromonadales beobachtet. Es wurde daher auf die Differenzierung ungebundener Lipide der Bakterien verzichtet.

Für Übersichtsanalysen aller Proben wurden nicht veresterte und estergebundene FA gemeinsam in ihre ME-Derivate überführt. Hierzu wurden 3 bis 5 mg lyophilisiertes Zellmaterial mit TMCS/MeOH (1:8, v/v) versetzt und für 1 h auf 80°C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde fast bis zur Trockene eingengt und mehrfach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden auf Kieselgel (MERCK Kieselgel 60, Korngröße 0,0063–0,200 mm) in einer kleinen Glassäule chromatographiert. Apolare bis semipolare Komponenten wurden mit DCM/EE (3:1, v/v) eluiert. Zur Lokalisierung der Doppelbindungsposition in einfach ungesättigten FAME ausgewählter Bakterienisolate wurden diese in ihre DMDS-Addukte bzw. *N*-acyl-Pyrrolidide überführt. Die Vermessung der Fraktionen erfolgte mit GC und GC-MS.

### II.3.2 Fraktionierung intakter Phospholipide aus Schwammextrakten

Wie Voruntersuchungen zeigten, sind infolge der Labilität von Phospholipiden nur frische bzw. stabilisierte Lipidextrakte aus Poriferen für entsprechende Untersuchungen geeignet. Aus diesem Grund wurden die organischen Extrakte der Schwämme direkt vor der Analyse der Phospholipidklassen gewonnen.

Nach Extraktion der Lipide aus dem Schwammgewebe wurden diese nach der Methode von PRIVETT *et al.* (1973) und SMITH *et al.* (1986) in modifizierter Form flüssigchromatographisch an SiO<sub>2</sub> 60 (MERCK, Korngröße 0,063–0,200 mm) in die nominellen Fraktionen der Neutrallipide (5,6 Gelbettvolumina (GBV) DCM), der Glycolipide (5,6 GBV Aceton) und der Phospholipide (8,3 GBV MeOH) entsprechend ihrer Polarität fraktioniert. Während die Neutrallipidfraktion underivatisiert mit GC- und GC-MS vermessen wurde, wurden Verbindungen der Glycolipidfraktion vor der Analyse methyliert (TMCS/MeOH) bzw. trimethylsilylverether (BSTFA). Die Überprüfung der Reinheit der Phospholipidfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch an SiO<sub>2</sub> 60 (MERCK, DC-Glasplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 cm, Konzentrierungszone 20 x 2,5 cm) mit Aceton als Laufmittel und mit Molybdän-Blau-Lösung bzw. I<sub>2</sub>-Dampf zur Visualisierung.

Zur DC-Trennung der Phospholipide aus Schwammextrakten an Kieselgel 60 (s. oben) erwies sich auch hier das häufig genutzte Gemisch aus CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (63:35:4; v:v:v) als geeignete mobile Phase (ZIMMERMAN *et al.*, 1990; GARSON *et al.*, 1994). Unter diesen Bedingungen ergibt sich die Reihenfolge der Phospholipidklassen zunehmender Retention DPG/PG < PE < PS/PI < PC (HELMY und HACK, 1986; GARSON *et al.*, 1994). Die Überprüfung des Trennerfolges erfolgte mit Hilfe der

käuflichen Phospholipid-Standards PE, PI und PC (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), die simultan auf einem Teil der zur Fraktionierung eingesetzten DC-Platte eluiert wurden.

Nach der Chromatographie wurde die DC-Platte mit der Elutionsrichtung in zwei Teile zerlegt, die die Schwammphospholipide einerseits sowie die Standard- und Schwammphospholipide andererseits umfassten. Nach Visualisierung mit für die Phosphogruppen spezifischen Sprühreagenzien (Dragendorffs Reagenz, Ninhydrin, Periodat-Schiffs Reagenz) bzw. den universellen Indikatoren Rhodamin 6G (UV 366nm), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung oder I<sub>2</sub>-Dampf der Standardkomponenten und einem Teil der fraktionierten Schwammphospholipide wurden die R<sub>F</sub>-Werte der Banden bestimmt.

Zur Freisetzung der Komponenten wurden die Kieselgelbanden in Glassäulen überführt und ausgiebig mit MeOH eluiert. Nach Einengung der Fraktionen *in vacuo* wurde zur Stabilisierung der Phospholipide 2,6-Di-*tert.*-butyl-4-methylphenol (0,002%) zugegeben und mit Ar überschichtet. Jeweils ein Aliquot der Lösungen wurde zur Transveresterung mit TMCS/MeOH umgesetzt und die Reaktionsprodukte nachfolgend mit GC und GC-MS vermessen. Zur relativen Quantifizierung der Verteilung individueller Fettsäuren in den jeweiligen Phospholipidklassen wurden die Extrakte in gleichen Lösungsmittelvolumina aufgenommen und erneut gaschromatographisch vermessen.

### II.3.3 Analyse der Bindungsformen von *bishomo*-Hopansäure

Zur Untersuchung der Bindungsformen von Säuren hopanoider Struktur in Poriferen wurden zwei Aliquots gleicher Einwaage des gesamtorganischen Extraktes (DCM/MeOH) von *Geodia macandrewii* mit Diazomethan/Diethylether-Lösung (Aliquot 1) bzw. TMCS/MeOH (Aliquot 2) behandelt. Die Lipide des Aliquots 2 wurden nach herkömmlicher Methode gewonnen (s. II.2.3).

Nach Reaktion des gesamtorganischen Extraktes mit Diazomethan und Trocknung unter einem N<sub>2</sub>-Strom wurden die ungebundenen Komponenten des Aliquots 1 mit *n*-Hexan extrahiert. Da hierbei keine vollständige Lösung zu beobachten war, wurde das verbliebene Material in Dichlormethan aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und ein gleiches Volumenteil einer Diazomethan/Et<sub>2</sub>O-Lösung zugegeben. Nach Reaktion wurden umgesetzte Lipide mit *n*-Hexan extrahiert.

Das verbliebene Extraktmaterial des *Aliquots 1* wurde zur Hydrolyse gebundener Verbindungen abschließend mit TMCS/MeOH behandelt. Zur Quantifizierung der Anteile freier und gebundener Hopansäuren wurden die jeweiligen Fraktionen in gleichen Lösungsmittelvolumina aufgenommen und gaschromatographisch vermessen. Die Identifizierung der 17β(H),21β(H)-*bishomo*-Hopansäure im Probenmaterial erfolgte durch Koelution mit einer authentischen Standardkomponente (Prof. Dr. P. Albrecht, *Laboratoire de Géochimie Bioorganique, Université Louis Pasteur, Strasbourg*)

## II.4 Analyse

In dieser Arbeit wurden die Fraktionen mittels Gaschromatographie (GC), Gaschromatographie und gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS) und partiell mit Hilfe komponentenspezifischer Gaschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie (GC-IRMS) untersucht. KW wurden direkt vermessen, während Verbindungen höherer Polarität, wie Alkohole und FA, als ihre Derivate analysiert wurden.

Die strukturelle Identifizierung von Verbindungen erfolgte anhand ihrer relativen GC-Retentionszeiten (Koinjektion mit authentischen und käuflichen Standards) und ihrer Massenspektren im Vergleich mit Literaturangaben. Von den in dieser Arbeit dargestellten Massenspektren wurde der Untergrund subtrahiert. Alle Massen sind in atomaren Masseneinheiten (amu) angegeben. Im Allgemeinen wurde die  $\Delta$ -Notation, bei der C-Atome vom Ende der funktionellen Gruppe gezählt werden, angewandt.

Die Quantifizierung von Einzelkomponenten erfolgte mit Hilfe interner Standardkomponenten bekannter Konzentration (5 $\alpha$ (H)-Cholestan, *n*-Tetracosan, *n*-HeneicosäureME) durch Vergleiche der Peakflächenintegrale im Chromatogramm.

### II.4.1 Gaschromatographie (GC)

Zur gaschromatographischen Analyse der Fraktionen wurden ‚fused silica‘-Kapillarsäulen eingesetzt.

#### GC-Bedingungen

Typ	Carlo Erba Strumentazione, Fractovap 4160 oder GC 6000 vega series 2
Säulentyp	DB-5MS, J&W Scientific
Filmdicke	0,25 $\mu\text{m}$
Innendurchmesser (ID)	0,32 mm
Säulenlänge	30 oder 60 m
Injektionsart	‚on-column‘
Trägergas	H <sub>2</sub>
Detektion	Flammenionisationsdetektoren (FID) und ggf. Elektroneneinfangdetektor (ECD)
Software	Bruker Franzen Analytik (ChromStar), Version 3.10

Üblicherweise wurde folgendes Ofentemperaturprogramm gewählt: isotherm bei 80°C nach Injektion für 3 min, Aufheizrate 4°C min<sup>-1</sup> bis 310°C, isotherm bei 310°C für 30 min.

Für Vergleiche der Retentionszeiten wurden käufliche FAME-Gemische als externe Standards vermessen. Eingesetzt wurden SUPELCO™ 37 Component FAME Mix (47885-U) und SUPELCO™ Bacterial Acid Methyl Esters (26 Komponenten, 47080-U).

Um bei einem Vergleich des umfangreichen Probenmaterials eine rasche Erfassung und Strukturzuordnung auch teilweise gering konzentrierter Fettsäuren zu gewährleisten, wurden zur nominellen Beschreibung ihres relativen GC-Elutionsverhaltens die ECL-Werte (‚equivalent chain length‘) individueller ME-Derivate errechnet (GILLAN, 1983). Anhand verschiedener Standardgemische hat sich gezeigt, dass mit einer Funktionsgleichung vierter Ordnung eine ausreichende



Genauigkeit ( $r^2 = 0,9999997$ ) zur Beschreibung der Analyse von C<sub>12</sub>- bis C<sub>25</sub>-FAME mit dem beschriebenen System erreicht werden kann. Tabelle C3 gibt die ECL-Werte der für diese Arbeit relevanten FAME wieder.

**Tabelle C3** ECL-Werte ausgewählter FAME aus Standardgemischen (berechnet auf Basis ihrer relativen Retentionszeiten).

Komponente	ECL	Komponente	ECL
<i>n</i> -C <sub>11:0</sub>	<b>11,00</b>	<i>i</i> -C <sub>17:0</sub>	16,63
2-OH-C <sub>10:0</sub>	11,05	<i>n</i> -C <sub>17:1</sub> Δ <sup>10</sup>	16,77
<i>n</i> -C <sub>12:0</sub>	<b>12,00</b>	C <sub>17:0</sub> cyce <sub>9,10</sub>	16,80
<i>n</i> -C <sub>13:0</sub>	<b>13,00</b>	<i>n</i> -C <sub>17:0</sub>	<b>17,00</b>
2-OH-C <sub>12:0</sub>	13,08	2-OH-C <sub>16:0</sub>	17,14
3-OH-C <sub>12:0</sub>	13,39	<i>n</i> -C <sub>18:2</sub> Δ <sup>9,12</sup>	17,61
<i>n</i> -C <sub>14:1</sub> Δ <sup>9</sup>	13,86	<i>n</i> -C <sub>18:2</sub> Δ <sup>?,?</sup>	17,64
<i>n</i> -C <sub>14:0</sub>	<b>14,00</b>	<i>n</i> -C <sub>18:1</sub> Δ <sup>9cis</sup>	17,69
<i>i</i> -C <sub>15:0</sub>	14,64	<i>n</i> -C <sub>18:1</sub> Δ <sup>9trans</sup>	17,77
<i>ai</i> -C <sub>15:0</sub>	14,71	<i>n</i> -C <sub>18:0</sub>	<b>18,00</b>
<i>n</i> -C <sub>15:1</sub> Δ <sup>10</sup>	14,86	C <sub>19:0</sub> cyce <sub>9,10</sub>	18,81
<i>n</i> -C <sub>15:0</sub>	<b>15,00</b>	<i>n</i> -C <sub>19:0</sub>	<b>19,00</b>
2-OH-C <sub>14:0</sub>	15,12	<i>n</i> -C <sub>20:5</sub> Δ <sup>?,?,?,?,?</sup>	19,23
3-OH-C <sub>14:0</sub>	15,42	<i>n</i> -C <sub>20:4</sub> Δ <sup>?,?,?,?</sup>	19,29
<i>i</i> -C <sub>16:0</sub>	15,63	<i>n</i> -C <sub>20:0</sub>	<b>20,00</b>
<i>n</i> -C <sub>16:1</sub> Δ <sup>9</sup>	15,75		
<i>n</i> -C <sub>16:0</sub>	<b>16,00</b>		

(Säulentyp: DB5-MS, Filmdicke 0,25 μm, ID 0,32 mm)

## II.4.2 Gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die massenspektrometrische Vermessung von Einzelkomponenten wurde mit einem Micromass Quattro II Quadrupol-MS (Micromass) gekoppelt an einen HP GC (6890) oder mit einem MD 800 Quadrupol-Massendetektor (Fisons Instruments) mit vorgeschaltetem Fisons GC (HP 8060) durchgeführt. Die Gaschromatographie erfolgte bei beiden Systemen mit ‚fused silica‘-Kapillarsäulen. Die Ionisierung der Komponenten wurde im EI-Modus durchgeführt.

### GC-Bedingungen

Säulentyp	DB-5MS, J&W Scientific
Filmdicke	0,25 μm
Innendurchmesser (ID)	0,32 mm
Säulenlänge	30 m
Injektionsart	‚on-column‘
Trägergas	H <sub>2</sub>
Interface-Temperatur	300 °C

### MS-Bedingungen

Temperatur der Ionenquelle	200°C
Ionisierungsenergie	70 eV
Scanbereich	50–600 amu
Software	MassLynx 3.4 (Micromass Ltd.)

Üblicherweise wurde folgendes Ofentemperaturprogramm gewählt: isotherm bei 80°C nach Injektion für 5 min, Aufheizrate 4°C min<sup>-1</sup> bis 310°C, isotherm bei 310°C für 30 min. Bei der Analyse acetylierter gesamtorganischer Extrakte wurde eine für den Nachweis intakter Hopanpolyole geeignete GC-Säule relativ geringer Länge (DB-5HT, J&W Scientific, 15m Länge, 0,1 µm Filmdicke, 0,32 mm ID) eingesetzt (Innes et al., 1997; Farrimond et al., 2000).

### II.4.3 Gekoppelte Gaschromatographie-Combustion-Isotopenmassenspektrometrie (GC-C-IRMS)

Die Anteile stabiler Kohlenstoffisotope in Einzelkomponenten werden mit Hilfe eines Isotope Ratio Monitoring Massenspektrometer (IRMS), dem ein GC vorgeschaltet ist, bestimmt. Von der Trennsäule eluierende Verbindungen werden in einen Verbrennungsofen (CuO/Ni/Pt) zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O konvertiert. Das Verbrennungsgas wird nachfolgend mit Hilfe einer Nafion®-Membran von H<sub>2</sub>O befreit. Mit dem Sektorfeld-Massenspektrometer werden die Anteile des eingeleiteten <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> (*m/z* = 44) und des <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (*m/z* = 45) einer jeweiligen Verbindung analysiert.

Die komponentenspezifische GC-IRMS wurde mit einem Finnigan DeltaPlusXL Massenspektrometer, das mit einem HP 6890 GC und einer Verbrennungslinie von Finnigan GC combustion III gekoppelt ist, durchgeführt. Die C-Isotopenverhältnisse werden üblicherweise in der Delta-Notation in Promille (δ<sup>13</sup>C ‰ vs. VPDB) angegeben und errechnen sich nach folgender Formel:

$$R = {}^{13}\text{CO}_2 / {}^{12}\text{CO}_2$$

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰} = [(R_{\text{Pr}} - R_{\text{St}}) / R_{\text{St}}] \times 1000$$

mit  $R_{\text{Pr}}$ : dem stabilen C-Isotopenverhältnis der Probe

$R_{\text{St}}$ : dem stabilen C-Isotopenverhältnis des Standards.

Die für das Probenmaterial gemessenen δ<sup>13</sup>C-Werte sind arithmetische Mittelwerte aus mindestens drei Messläufen. Die Standardabweichungen betragen weniger als 0,5 ‰. Die Messungen wurden gegen einen externen Standard bekannter C-Isotopzusammensetzung kalibriert. δ<sup>13</sup>C-Werte der FAME wurden bezüglich der Isotopensignatur des Derivatisierungsreagenz korrigiert.

#### GC-Bedingungen

Säulentyp	,fused silica', HP5-Trace
Filmdicke	0,25 µm
Innendurchmesser (ID)	0,25 mm
Säulenlänge	30 m
Trägergas	He

Die Injektion erfolgte mit einem CTC A200S-Autosampler in ein KAS4-Kaltaufgabe-System der Firma GERSTEL. Übliches Desorptionsprogramm: 48°C (0 min)–12°C sec<sup>-1</sup>–310°C (10 min). Übliches GC-Temperaturprogramm: 80°C (3 min)–4°C min<sup>-1</sup>–310 °C (20 min). Die EDV-Auswertung erfolgte mit der FINNIGAN-Software ISODAT (V. 7.4).

## C III Verwendete Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Kürzel</b>	<b>Bruttoformeln</b>
Acetanhydrid		$C_4H_6O_3$
<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid	BSTFA	$C_8H_{18}F_3NOSi_2$
Dichlormethan	DCM	$CH_2Cl_2$
Diazomethan		$CH_2N_2$
Diethylether	Et <sub>2</sub> O	$C_4H_{10}O$
Dimethyldisulfid	DMDS	$C_2H_6S_2$
Ethylacetat (Essigsäureethylester)	EE	$C_4H_8O_2$
Ethanol	EtOH	$C_2H_5OH$
Iodwasserstoff		HI
Kaliumdihydrogenphosphat		$KH_2PO_4$
Kaliumhydroxid		KOH
Lithiumaluminiumhydrit		$LiAlH_4$
Methanol	MeOH	$CH_3OH$
Natriumborhydrit		$NaBH_4$
Natriumsulfat		$Na_2SO_4$
Natriumthiosulfat		$Na_2S_2O_3$
Periodsäure		$H_5IO_6$
Pyridin		$C_5H_5N$
Tetrahydrofuran	THF	$C_4H_8O$
Trimethylchlorosilan	TMCS	$(CH_3)_3SiCl$
Wasserstoff		$H_2$

**D I Physiko- und hydrochemische Daten im Gebiet des Sula-Rückens  
(POS 254, Sommer 1999)**

Schiff- station	Tiefe	Salinität	pH <i>in situ</i>	DIC <sub>SAL35</sub>	DOC	gelöster O <sub>2</sub>	gelöstes CH <sub>4</sub>
	[m]			[ $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\text{nmol L}^{-1}$ ]
<b>01 MS</b>	12,1		8,259	2160,62			
	25,0		8,192	2156,68			
	202,0		8,149	2121,38			
	232,9		8,145	2123,59			
	246,3		8,144	2123,80			
	268,4		8,147	2125,91			
	268,7		8,146	2123,99			
	287,9		8,145	2124,61			
	297,5		8,149	2123,95			
307,1		8,144	2124,69				
<b>05 MS</b>	17,0		8,217	2147,27	107,5	282,2	14,64
	50,8		8,153	2130,60	79,1	260,9	17,39
	81,5		8,119	2138,39	68,3	241,9	16,01
	111,5		8,127	2128,60	51,6	257,5	18,87
	201,0		8,120	2127,35	45,8	272,8	27,87
	250,6		8,126	2127,81	44,1		23,99
	273,9		8,129	2127,97	47,5		22,85
	274,1		8,136	2128,76	58,3		22,60
	300,9		8,135	2130,98	100,8		21,40
	311,6		8,179	2127,98	70,8		22,27
	327,0						
<b>16 MS</b>	172,6		8,166	2126,58	60,8	261,3	
	172,6		8,168	2126,45	62,5	277,2	
	211,9		8,170	2127,95		271,9	
	212,7		8,169	2128,65	74,1	266,3	
	242,6		8,170	2129,45	56,6	269,7	
	243,4		8,171	2128,46	70,8	275,3	
	262,7		8,173	2129,61	74,1	277,5	
	263,1		8,159	2128,80	54,1	269,1	
	277,8		8,169	2128,99	54,1	277,5	
	277,9		8,169	2128,87	128,3	275,3	
	289,0		8,168	2128,24	58,3	275,6	
	289,9		8,171	2127,32	64,1	276,9	
<b>18 JA</b>	<b>289,0</b>			2130,19	45,0		18,14
<b>19 MS</b>	202,0	35,214	8,144	2125,37	78,3	245,6	20,06
	226,7	35,220	8,145	2127,62	62,5		19,20
	250,3	35,244	8,145	2130,57	68,3	247,5	21,43
	279,0	35,242	8,143	2127,69	69,1	272,2	21,57
<b>20 JA</b>	<b>289,0</b>	35,241		2129,79	44,1		20,60

## Fortsetzung D I Physiko- und hydrochemische Daten im Gebiet des Sula-Rückens

Schiff- station	Tiefe	Salinität	pH <i>in situ</i>	DIC <sub>SAL35</sub>	DOC	gelöster O <sub>2</sub>	gelöstes CH <sub>4</sub>
	[m]			[ $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\text{nmol L}^{-1}$ ]
23 MS	201,1		8,107	2123,88	51,6	274,1	22,35
	250,3		8,118	2123,79			20,58
	289,0		8,132	2122,84	51,6	274,1	23,10
	308,6		8,127	2124,40	62,5	273,4	19,45
	324,4		8,133	2125,08	63,3	247,2	20,01
	334,7		8,128	2124,66	42,5	274,4	21,44
	344,3		8,102	2125,82	60,8	277,5	19,57
27 MS	152,7	35,156	8,150	2132,39	52,5	254,4	16,92
	201,7		8,150	2128,66	65,8	264,4	18,57
	227,0	35,244	8,146	2129,68	57,5	239,1	24,41
	252,1	35,246	8,147	2130,72	66,6	237,2	22,18
	277,1	35,237	8,142	2129,81	40,8	275,3	20,91
	297,2	35,239	8,144	2130,96	78,3	255,6	21,92
	306,8	35,236	8,154	2130,64	68,3	255,0	
	317,2	35,237	8,168	2130,01	62,5	275,9	21,71
30 JA	299,0			2127,04	41,7		21,41
31 MS	201,5	35,213		2129,11	44,1		19,62
	241,8	35,298	8,137	2131,34	60,0		20,93
	261,5	35,219	8,138	2128,27	50,0	270,3	21,20
	281,4	35,221	8,139	2129,41	52,5	264,1	23,44
	298,1	35,221	8,141	2131,91	57,5	244,4	22,30
32 JA	320,0			2134,86	51,6		22,92
34 MS	6,7		8,220	2182,81	74,1	267,2	14,52
	27,0		8,178	2152,22	73,3	256,6	15,86
	51,8		8,125	2154,37	57,5		18,03
	82,2		8,104	2139,71	61,6		18,92
	111,6		8,112	2137,75	82,5		14,14
	141,9		8,121	2130,77	63,3		20,15
	161,7		8,119	2131,25	60,8		17,80
	192,0		8,123	2132,55	84,1		18,29
	212,2		8,125	2128,41	35,8		20,93
	232,1		8,118	2130,58	65,0	236,9	23,91
	251,9		8,115	2129,96	46,6		20,38
	264,4		8,122	2135,32	65,8	267,5	21,76

## Fortsetzung D I Physiko- und hydrochemische Daten im Gebiet des Sula-Rückens

Schiff- station	Tiefe	Phosphat	Silikat	Ammonium	Nitrit	Nitrat
	[m]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]
05 MS	17,0	0,08	1,78	0,46	0,030	0,28
	50,8	0,73	3,32	1,03	0,206	8,12
	81,5	0,97	8,04	0,82	0,046	10,50
	111,5	0,93	5,76	0,51	0,019	10,94
	201,0	1,00	8,56	0,52	0,032	11,95
	250,6	0,93	7,56	0,52	0,106	12,19
	273,9	0,81	7,35	0,58	0,056	11,82
	274,1	0,70	7,49	0,66	0,053	11,35
	300,9	0,64	5,30	0,34	0,049	11,10
	311,6	0,66	7,22	0,25	0,043	10,93
	327,0	0,19	1,72	1,04	0,086	1,27
16 MS	172,6	0,91	7,94	0,74	0,048	11,80
	172,6	0,58	6,38	1,18	0,068	10,65
	211,9	0,94	6,37	1,14	0,097	12,19
	212,7	0,59	6,13	0,65	0,044	10,52
	242,6	0,96	9,83	0,92	0,056	12,27
	243,4	0,93	8,79	1,10	0,072	12,10
	262,7	1,01	8,94	0,64	0,057	12,43
	263,1	0,87	8,88	0,90	0,064	12,21
	277,8	1,08	6,61	2,11	0,061	12,43
	277,9	1,07	9,66	1,04	0,090	13,29
	289,9	0,94	8,86	0,86	0,097	12,41
	289,0	0,76	7,41	0,70	0,067	11,64
	18 JA	289,0	0,73	5,96	0,85	0,076
19 MS	202,0	1,31	7,55	1,81	0,060	11,92
	226,7	0,94	14,14	0,87	0,071	11,69
	250,3	1,03	10,39	0,70	0,043	12,22
	279,0	0,98	6,11	0,64	0,038	12,22
20 JA	289,0	0,73	9,69	10,10	0,048	12,48
23 MS	201,1	0,07	9,15	0,53	0,259	5,50
	250,3	0,41	9,61	0,61	0,056	10,52
	289,0	0,58	7,84	0,50	0,127	9,17
	308,6	0,08	21,85	0,53	0,095	4,92
	324,4	0,47	6,99	0,46	0,036	9,00
	334,7	0,07	9,06	0,52	0,424	6,19
	344,3	0,07	10,04	0,54	0,347	1,96

## Fortsetzung D I Physiko- und hydrochemische Daten im Gebiet des Sula-Rückens

Schiff- station	Tiefe	Phosphat	Silikat	Ammonium	Nitrit	Nitrat
	[m]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ]
27 MS	152,7	0,10	6,30	0,71	0,120	11,28
	201,7	0,09	9,50	0,60	0,142	1,81
	227,0	0,34	9,47	0,75	0,314	7,56
	252,1	0,12	10,94	0,58	0,057	1,43
	277,1	0,46	9,09	0,58	0,150	8,55
	297,2	0,47	7,78	0,57	0,236	9,38
	306,8	0,65	10,28	0,65	0,063	10,91
	317,2	0,29	7,72	0,57	0,120	7,48
30 JA	299,0	0,34	8,88	0,69	0,190	7,75
31 MS	201,5	0,31	7,08	0,67	0,506	6,60
	241,8	0,08	9,02	0,65	0,204	6,50
	261,5	0,06	10,02	0,82	0,343	8,13
	281,4	0,11	10,83	0,65	0,182	8,69
	298,1	0,17	7,80	0,65	0,287	5,94
32 JA	320,0	0,07	10,87	0,94	0,182	0,08
34 MS (double measurements)	6,7	0,03	3,31	1,10	0,100	0,16
	27,0	0,04	3,28	0,91	0,114	4,84
	51,8	0,04	5,56	0,63	0,223	2,86
	82,2	0,04	8,39	0,67	0,245	2,41
	111,6	0,16	7,79	0,58	0,292	7,13
	141,9	0,10	7,48	0,62	0,237	0,19
	161,7	0,05	7,20	0,96	0,617	0,53
	192,0	0,32	8,99	0,93	0,358	6,74
	212,2	0,32	6,86	1,03	0,300	6,17
	232,1	0,24	10,14	0,96	0,290	6,48
	251,9	0,38	8,53	0,94	0,252	8,72
	264,4	0,40	11,93	1,28	0,238	8,97

**D II Fettsäurezusammensetzung in Isolaten schwammassoziiierter Bakterien**

Taxonomie	α-Proteo. sp. 1		Springomonas sp.				Erythrobacter longus				Roseobacter algicola		Rhodobacter sp.		
	HAL MBA 17b	Hal CSA 62ad	Hal CSA 60	OR CSA 9	OR CSA 10	PS CSA 6	PS CSA 10	Hal MBA 18	Geo MBA 4/5.2.1	ORS BMM 2	ORS BMM 3				
<i>n</i> -C <sub>2:0</sub>	0,2		0,1		0,2	0,1	0,4	0,1	0,1			0,1			
<i>n</i> -C <sub>3:0</sub>			0,2		0,4	0,2	0,2	0,1						1,6	
<i>n</i> -C <sub>4:0</sub>	0,1		0,3	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2				0,1			
<i>n</i> -C <sub>16:0</sub>		0,2	0,7	0,2	0,3	0,5	0,4	7,9	0,1			6,9		1,8	0,3
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub>	6,8	4,9	9,9	10,0	11,6	10,7	12,3	0,3	0,3			0,3		0,7	1,0
<i>n</i> -C <sub>17:0</sub>	0,2	1,1	0,6	0,4	0,2	0,4	0,5	8,6	7,5			4,2		6,3	
<b>Σ <i>n</i>-SCFA</b>	<b>7,2</b>	<b>6,2</b>	<b>11,7</b>	<b>10,7</b>	<b>12,6</b>	<b>11,9</b>	<b>13,7</b>								
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub> + <i>me</i> -C <sub>18:1</sub>	5,4	2,6	10,0	6,4	9,6	14,9	13,6	0,8	7,6			6,1		16,1	
(11 <i>me</i> -C <sub>18:1</sub> ) <sup>13</sup>						(11 <i>me</i> -C <sub>18:1</sub> ) <sup>13</sup>									
<b>'summed in feature'</b>	<b>5,4</b>	<b>2,6</b>	<b>10,0</b>	<b>6,4</b>	<b>9,6</b>	<b>14,9</b>	<b>13,6</b>	<b>0,8</b>	<b>7,6</b>			<b>6,1</b>		<b>16,1</b>	
C <sub>16:1</sub>	15,78	16,0	12,1	16,2	17,4	10,9 (Δ9)	12,3 (Δ9)	1,5 (Δ9)	1,7						
C <sub>16:1</sub>	15,87	1,1	0,7	1,0	0,7	2,8 (Δ11)	0,5	0,2 (Δ9)	0,2						
C <sub>17:1</sub>	16,77	1,0	3,2	1,0	1,3	0,1	2,0	0,2							
C <sub>18:1</sub>	17,69	0,5	49,9	59,9	53,8	55,7 (Δ11)	57,1 (Δ11)	81,6 (Δ11)	79,7			83,9		73,7	
C <sub>18:1</sub>	17,76	64,4 (Δ11)	65,8	77,2	73,4	69,5	59,6	83,4	81,6			83,9		73,7	
<b>Σ monoen-SCFA</b>	<b>65,4</b>	<b>76,3</b>	<b>65,8</b>	<b>77,2</b>	<b>73,4</b>	<b>69,5</b>	<b>59,6</b>	<b>83,4</b>	<b>81,6</b>			<b>83,9</b>		<b>73,7</b>	
C <sub>18:1</sub> /C <sub>16:1</sub>	161,0	3,4	3,9	3,7	3,0	5,1	4,5	54,5	46,9			n.def.		n.def.	
C <sub>18:2</sub>	17,48	15,8							1,2					1,1	
C <sub>18:2</sub>	17,56	0,4						6,1							
<b>Σ dien-SCFA</b>	<b>16,3</b>	<b>16,3</b>						<b>6,1</b>	<b>1,2</b>					<b>1,1</b>	
3-OH-C <sub>10:0</sub>	11,42														
2-OH-C <sub>14:0</sub>	15,21	0,2	6,4	4,3	2,5	1,5	0,6	0,6						0,5	
2-OH-C <sub>16:0</sub>	16,22	0,1	0,6	1,4	1,4	1,7	1,7								
2-OH-C <sub>16:0</sub>	17,14	3,7	4,6	1,4	1,4	3,1	0,6								
Σ OH-SCFA	4,0	14,4	11,6	5,7	4,0	3,1								0,5	
<b>Σ nicht identifizierte SCFA</b>	<b>1,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>2,0</b>			<b>5,7</b>		<b>2,3</b>	

\*) siehe Methodenteil Gaschromatographie



Fortsetzung D II Fettsäurezusammensetzung in Isolaten schwammassoziiierter Bakterien

Taxonomie	γ-Proteobac. sp.		Pseudomonas stutzeri						Pseudom. chloro.	Pseudom. sp.			Vibrio splendidus
	Hal MBA 40 b <sub>0</sub>	Geo MBA 417.1	OR CDC 2	HAL MBA 16	HAL MBA 17a	HAL MBA 43a	P MBA 216h	PS CSA 2		PS CSA 7	OR CDC 5	Geo MBA 3/22.2.1	
<i>n</i> -C <sub>10:0</sub>		10,07											
<i>n</i> -C <sub>11:0</sub>		11,00											
<i>n</i> -C <sub>12:0</sub>		12,00											
<i>n</i> -C <sub>13:0</sub>		13,07											
<i>n</i> -C <sub>14:0</sub>		13,99											
<i>n</i> -C <sub>15:0</sub>		15,00											
<i>n</i> -C <sub>16:0</sub>		16,00											
<i>n</i> -C <sub>17:0</sub>		17,00											
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub>		18,00											
<b>Σ <i>n</i>-SCFA</b>		25,1	38,3	25,1	17,1	19,5	14,7	32,0	29,2	27,2	18,5	37,4	
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub> + <i>me</i> -C <sub>18:1</sub>		18,00-18,04											
<b>summed in feature'</b>													
C <sub>12:1</sub>	11,74												
C <sub>13:1</sub>	12,72-12,76												
C <sub>14:1</sub>	13,77												
C <sub>15:1</sub>	14,76-14,82												
C <sub>16:1</sub>	15,76-15,84												
C <sub>17:1</sub>	16,77-16,85												
C <sub>18:1</sub>	17,72-17,81												
C <sub>19:1</sub>	18,77												
<b>Σ monoen-SCFA</b>		68,4	56,5	67,7	80,5	76,5	79,7	63,9	66,1	68,9	75,7	54,3	
<i>i</i> -C <sub>18:1</sub> / <i>i</i> -C <sub>18:1</sub>		0,8	0,3	1,3	1,1	1,0	1,7	1,1	1,5	1,7	2,8	0,3	
<i>i</i> -C <sub>13:0</sub>	12,65												
<i>i</i> -C <sub>14:0</sub>	13,63												
<i>i</i> -C <sub>15:0</sub>	14,63												
<i>i</i> -C <sub>16:0</sub>	15,63												
<i>i</i> -C <sub>17:0</sub>	16,63												
<i>i</i> -C <sub>18:0</sub>	17,63												
<b>Σ iso-SCFA</b>		2,9	0,9	1,4	0,7	1,0	1,1	3,0	3,3	1,9	1,8	2,8	
<i>ai</i> -C <sub>14:0</sub>	13,73												
<i>ai</i> -C <sub>15:0</sub>	14,70												
<i>ai</i> -C <sub>16:0</sub>	15,73												
<i>ai</i> -C <sub>17:0</sub>	16,72												
<b>Σ anteiso-SCFA</b>													
10-Me-C <sub>16:0</sub>	16,42												
<b>Σ mcb-SCFA</b>													
3-OH-C <sub>10:0</sub>	11,38												
3-OH-C <sub>11:0</sub>	12,43												
3-OH-C <sub>12:0</sub>	13,39												
<b>Σ OH-SCFA</b>		1,2											
<b>Σ nicht identifizierte SCFA</b>		2,3	4,3	2,8	1,4	2,9	3,1	0,3	0,9	0,9	3,3	3,0	

\*) siehe Methode in Gaschromatographie

Fortsetzung D II Fettsäurezusammensetzung in Isolaten schwammassoziierten Bakterien

Taxonomie	Alterom. <i>maeleodii</i>		Colwellia sp.				Marinobacter sp.				Pseudoaltero. <i>atlantica</i>				Pseudoalteromonas carrageenovora						
	Isolat ECL *)	Geo MBA 3/7.1	HAL MBA 11a	HAL MBA 11b	HAL MBA 11c	HAL MBA 44d	Geo MBA 1/1.1	Hal MBA 31	P MBA 228w	Geo MBA 2/5.3.1	HAL MBA 7	HAL MBA 8a	HAL MBA 9b1	HAL MBA 32	P MBA 229h	Geo MBA 4/6.1	HAL MBA 7	HAL MBA 8a	HAL MBA 9b1	HAL MBA 32	P MBA 229h
<i>n</i> -C <sub>10:0</sub>	10,00		0,5	0,2		0,1										0,1	0,1				
<i>n</i> -C <sub>11:0</sub>	11,00		0,1	0,1		0,1										0,4	0,4				
<i>n</i> -C <sub>22:0</sub>	12,00	1,6	0,4	0,3		0,2	3,9	7,4	0,5						0,1	0,1		0,3			1,9
<i>n</i> -C <sub>24:0</sub>	13,00		0,2	0,2		0,2	0,1	0,4	0,5						0,2	0,2		0,2			
<i>n</i> -C <sub>26:0</sub>	14,00	3,2	1,7	1,7		1,5	0,2	0,8	1,3						0,7	0,8	1,7	1,7			
<i>n</i> -C <sub>28:0</sub>	15,00	1,0	3,1	5,6		4,6	0,3	0,6	2,3						0,7	0,8	4,0	3,1			9,6
<i>n</i> -C <sub>30:0</sub>	16,00	21,8	31,8	18,2		17,1	25,4	19,6	23,4						27,3	17,5	12,5	31,1			8,0
<i>n</i> -C <sub>32:0</sub>	17,00	4,0	3,5	2,3		2,3	3,1	4,3	4,7						0,4	0,4	1,8	1,5			1,4
<i>n</i> -C <sub>34:0</sub>	18,00	6,1	4,0	0,9		0,9	4,9	4,6	4,7						1,2	3,3	2,1	5,0			2,0
Σ n-SCFA		38,0	45,1	28,7		27,0	37,9	28,8	32,3						30,1	32,7	22,7	40,9			22,3
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub> + me-C <sub>18:1</sub> 'summed in feature'		18,00-18,04	1,2						1,3												
C <sub>12:1</sub>	11,74	0,1		0,1		0,1	0,1	0,2	0,6						0,1 (Δ5)		0,7	0,5			
C <sub>13:1</sub>	12,72-12,76					0,1	0,1	0,5	0,1 (Δ5)						0,1	0,2	0,3	0,1			0,2
C <sub>14:1</sub>	13,77	0,5	1,3			1,8	2,1	3,4	0,5 (Δ7)						0,7 (Δ7)	0,5	1,1	0,7			0,8
C <sub>16:1</sub>	14,76-14,82	0,9	4,2 (Δ7)			7,7	0,3	0,2	1,3 (Δ7, Δ9)						0,2 (Δ7)		3,5	0,6			1,4
C <sub>18:1</sub>	15,76-15,84	32,2	33,9 (Δ7, Δ9)			43,9	33,9	40,6	44,3 (Δ7, Δ9, Δ11)						47,3 (Δ7, Δ9)	37,1 (Δ7, Δ9)	46,4	39,6 (Δ9)			43,2
C <sub>17:1</sub>	16,77-16,85		6,6 (Δ9)			11,8	4,1	3,3	8,3 (Δ9, Δ11)						11,1 (Δ9, Δ11)	11,7 (Δ9, Δ11)	6,3	2,5			7,6
C <sub>20:1</sub>	17,72-17,81	17,7	4,0 (Δ9, Δ11)			3,2	15,1	16,5	7,1 (Δ9, Δ11)						11,4 (Δ11)	11,1 (Δ11)	11,3	10,9			8,7
C <sub>26:1</sub>	18,77	1,1							0,6 (Δ11)						0,6	0,5	0,5	0,2			2,1
Σ monoen-SCFA		52,5	49,9	60,8		68,6	55,7	64,3	62,5						61,5	64,5	70,3	54,9			57,5
C <sub>16:2</sub> /C <sub>18:2</sub>		0,6	0,1	<0,1		0,1	0,5	0,4	0,2						0,2	0,3	<0,1	0,3			0,1
I-C <sub>13:0</sub>	12,65						0,1	0,2	0,3						0,1						1,7
I-C <sub>14:0</sub>	13,63	0,1							0,2									0,1			0,2
I-C <sub>15:0</sub>	14,63	0,1							0,2						2,3	1,3	0,9	0,8			1,2
I-C <sub>16:0</sub>	15,63	0,4	1,3	0,5		0,4	0,2	0,1	2,1						0,1	0,5	0,1	0,6			0,3
I-C <sub>17:0</sub>	16,63	0,1	0,4	0,2		0,2	0,3	0,2	0,2						0,2	0,1	0,1	0,6			0,3
I-C <sub>18:0</sub>	17,63	0,5	0,4	0,1		0,1	0,1	0,1	0,2						0,1	0,7	0,2	1,3			0,4
Σ Iso-SCFA		1,3	2,1	0,8		0,8	0,7	0,4	2,9						2,7	2,5	1,2	1,6			3,3
al-C <sub>14:0</sub>	13,73						0,1	0,1	0,1									0,2			0,2
al-C <sub>15:0</sub>	14,70								0,1									0,2			0,6
al-C <sub>16:0</sub>	15,73	6,7																0,7			1,1
al-C <sub>17:0</sub>	16,72																	0,5			0,5
Σ anteiso-SCFA		6,7	0,3	2,4		0,2	0,1	0,1	0,1						0,7	0,7	1,3	1,3			0,4
10-Me-C <sub>16:0</sub>	16,42						1,5	0,6	0,8									0,2			0,5
Σ mc6-SCFA							1,5	0,6	0,8									0,2			0,5
3-OH-C <sub>10:0</sub>	11,38		0,1	3,0		0,8	0,3	0,4	0,1									2,1			2,3
3-OH-C <sub>11:0</sub>	12,43	0,3	1,4	0,8		0,8	3,2	4,1	0,7						2,7	0,4	0,4	0,6			1,1
3-OH-C <sub>12:0</sub>	13,39		0,9	0,6		0,6	3,5	4,5	0,7						2,7	0,7	2,4	0,5			0,2
Σ OH-SCFA		0,3	0,1	5,4		2,1	3,5	4,5	0,7						2,7	2,4	2,4	1,3			3,6
Σ nicht identifizierte SCFA		1,1	1,3	1,9		1,3	0,5	1,2	0,0						2,9	0,3	2,7	1,0			12,3

\*) siehe Methodenteil Gaschromatographie

Fortsetzung D II Fettsäurezusammensetzung in Isolaten schwammassoziierten Bakterien

Taxonomie Isolat ECL *)	Pseudoalteromonas haloplanktis			Pseudoalteromonas nigrificans			Pseudoalteromonas sp.		
	Ph MBA 142d	Ph MBA 144cd	P MBA 223d	Geo MBA 3/21.2.1	Geo MBA 4/8.1	Geo MBA 4/4.2.1	Hal MBA 19	Hal MBA 20	Hal MBA 24
<i>n</i> -C <sub>10:0</sub>	70,00	0,1	0,1				1,1	0,1	0,1
<i>n</i> -C <sub>11:0</sub>	11,00	0,3	0,2				1,7	0,7	0,9
<i>n</i> -C <sub>12:0</sub>	12,00	2,4	1,4			0,7	0,3	0,3	0,3
<i>n</i> -C <sub>13:0</sub>	13,00	0,6	0,9			1,7	2,7	1,9	1,5
<i>n</i> -C <sub>14:0</sub>	14,00	1,1	3,0	2,1	1,3	7,4	0,5	2,4	2,4
<i>n</i> -C <sub>15:0</sub>	15,00	5,8	6,0	4,8	6,1	9,7	12,5	11,9	10,0
<i>n</i> -C <sub>16:0</sub>	16,00	6,4	11,3	16,0	16,7	2,8	2,7	2,6	2,2
<i>n</i> -C <sub>17:0</sub>	17,00	2,6	4,7	2,4	6,0	0,8	0,8	0,6	
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub>	18,00	0,4	0,7	1,3	1,3	0,8			
<b>Σ n-SCFA</b>	21,6	26,5	25,3	25,3	31,4	23,0	21,5	20,3	17,3
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub> + me-C <sub>18:1</sub>				1,7			8,2	3,1	4,0
<b>'summed in feature'</b>	18,00-18,04			1,7					
C <sub>12:1</sub>	11,74	1,0	0,8		1,1	1,4	0,2	0,4	0,6
C <sub>13:1</sub>	12,72-12,76	1,6	0,9			1,4	0,3	0,2	0,3
C <sub>14:1</sub>	13,77	1,2	2,0	0,7 (Δ7)	0,8	1,0	0,3 (Δ7)	1,1	1,4
C <sub>15:1</sub>	14,76-14,82	9,7	7,6	6,1 (Δ7, Δ9)	5,1 (Δ7)	7,5	0,5	1,5	2,4
C <sub>16:1</sub>	15,76-15,84	33,3	37,0	48,2 (Δ7, Δ9)	38,9 (Δ9, Δ11)	36,9	29,6 (Δ9)	26,5	31,5
C <sub>17:1</sub>	16,77-16,85	14,2	4,6	9,1 (Δ9, Δ11)	13,4 (Δ9, Δ11)	13,2	7,2 (Δ9)	12,2	12,4
C <sub>18:1</sub>	17,72-17,81	2,8	3,6	4,7 (Δ11)	5,9 (Δ11)	4,8	28,2 (Δ9, Δ11)	26,6	20,5
C <sub>19:1</sub>	18,77	0,3	0,5	0,2 (Δ11)	0,5	0,7			
<b>Σ monoen-SCFA</b>	64,1	63,7	63,4	69,1	65,6	65,5	66,4	68,7	69,0
C <sub>18:2</sub> /C <sub>16:2</sub>		0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	1,0	1,0	0,7
<i>i</i> -C <sub>13:0</sub>	12,65								
<i>i</i> -C <sub>14:0</sub>	13,63		0,3			0,1	0,3	0,2	0,1
<i>i</i> -C <sub>15:0</sub>	14,63	0,2	0,2	0,1		0,1	0,1	0,1	0,5
<i>i</i> -C <sub>16:0</sub>	15,63	1,3	2,3	1,9	1,2	1,4	0,8	0,7	1,5
<i>i</i> -C <sub>17:0</sub>	16,63	0,5	0,4	0,3	0,7	0,4	0,2		
<i>i</i> -C <sub>18:0</sub>	17,63	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1	1,6		
<b>Σ Iso-SCFA</b>	1,8	2,6	3,5	2,6	2,4	2,1	3,0	0,9	2,0
al-C <sub>14:0</sub>	13,73			0,1					
al-C <sub>15:0</sub>	14,70		0,3			0,2	0,3	0,2	0,1
al-C <sub>16:0</sub>	15,73					0,6	0,6	0,1	0,2
al-C <sub>17:0</sub>	16,72	0,4	0,3	0,4		0,3			
<b>Σ anteiso-SCFA</b>	0,4	0,3	0,7	0,1		1,1	0,3	0,4	0,3
10-Me-C <sub>16:0</sub>	16,42		0,3						
<b>Σ mcb-SCFA</b>		0,4	0,3						0,1
3-OH-C <sub>10:0</sub>	11,38				0,3				2,3
3-OH-C <sub>11:0</sub>	12,43	1,9	0,5			1,3	0,4	0,8	0,9
3-OH-C <sub>12:0</sub>	13,39								
<b>Σ OH-SCFA</b>	1,9	0,5	0,5	0,3	0,3	1,3	0,4	3,1	0,9
<b>Σ nicht identifizierte SCFA</b>		10,1	6,5	6,2	1,0	6,3	0,1	3,4	6,2

\*) siehe Methodenteil Gaschromatographie

## D III Verteilung der SCFA (Gew.-%) in Demospongiae

Dime = DimethylFA, PUFA = polyungesättigte FA

ECL	<i>Stryphnus ponderosus</i>	<i>Dragmastra normanni</i>	<i>Geodia barretti</i>	<i>Geodia macandrewii</i>	<i>Isops phlegraei</i>	<i>Pachymatisma johnstonii</i>	<i>Thenea muricata</i>	<i>Tentorium semisuberites</i>
<i>n</i> -C12:0	12,00	0,1			0,2	0,1	0,2	
<i>i</i> -C13:0	12,63		0,1		0,1			
<i>ai</i> -C13:0	12,70	1,0	0,1		0,1			
<i>i</i> -C14:0	13,63	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,9
<i>n</i> -C14:1	13,86							1,2
<i>n</i> -C14:0	14,00	1,6	1,3		2,2	1,9	1,6	4,7
3-Me-C15:0	14,36						0,2	
mcb C15:1	14,40							0,4
mcb 15:0	14,45	1,4	2,2	1,0	1,4	1,4	1,3	0,6
Trimethyltridecansäure	14,47							14,9
<i>i</i> -C15:0	14,63	6,3	5,9	5,5	5,4	5,4	6,6	6,8
<i>ai</i> -C15:0	14,70	3,7	4,2	3,6	3,8	3,1	3,5	2,5
<i>n</i> -C15:0	15,00	0,7	0,7	0,8	0,9	0,7	0,6	0,7
dime-C16:0	15,06		1,2	1,2	1,2	1,1	0,9	
mcb 16:1	15,36		0,1		0,1			
3-Me-C16:0	15,37			0,1		0,1		
mcb 16:0	15,41			0,1	0,2			
mcb16:0	15,46	0,9	1,1	0,9	1,2	0,9	1,2	1,0
<i>n</i> -C16:2	15,53	8,8	7,6		0,8	1,9	1,5	
mcb 16:0	15,51			0,1				
mcb 16:0	15,56							0,4
<i>i</i> -C16:0	15,63	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6
<i>ai</i> -C16:0	15,71	0,9				1,1		4,5
<i>n</i> -C16:1	15,71			0,8	1,2			
<i>n</i> -C16:1 (Δ9)	15,76	6,8	9,8	8,4	6,9	6,9	1,7	8,0
<i>n</i> -C16:1	15,79						8,9	
<i>n</i> -C16:1	15,86	2,3	1,9	2,4	2,1	2,0	1,8	1,0
<i>n</i> -C16:0	16,00	3,9	4,4	4,2	5,0	4,8	4,3	21,7
Dime-C17:0	16,05		0,2	0,4		0,2	0,5	
Me-C17:2	16,12	2,0	0,5	0,1	0,9	0,6	1,2	
Me-17:1?	16,21	1,1	0,5	0,4	0,5	0,7	0,2	
mcb 17:1	16,35	4,8	5,6	6,9	5,6	6,0	8,7	0,6
mcb 17:0	16,42	8,8	9,7	6,3	11,2	11,9	11,6	0,7
mcb 17:0	16,43			4,2				0,4
mcb 17:0	16,58	0,4			0,7	1,2		1,1
<i>i</i> -C17:0	16,63	0,8	1,5	2,4	0,9	1,2	1,8	0,9
<i>ai</i> -C17:0	16,70	1,4	1,3	2,1	2,0	1,9	1,7	4,1
C17:0 <sub>cy9,10</sub>	16,82	0,4	0,7	0,4	0,4	0,4		0,7
<i>n</i> -C17:1	16,88				0,1	0,1	0,6	12,3
<i>n</i> -C17:1	16,92		0,1					
<i>n</i> -C17:0	17,00	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5
mcb 18:0	17,40	0,7	0,7	0,9	1,3	1,2	1,1	
<i>n</i> -C18:1	17,70	0,7		0,7	1,1		0,8	3,5
<i>ai</i> -C18:0	17,71		0,8			1,1		
<i>n</i> -C18:1 (Δ11)	17,77	4,4	3,6	4,1	3,8	3,2	4,1	7,3
<i>n</i> -C18:1	17,87	0,3		0,1	0,2	0,2		1,1
<i>n</i> -C18:0	18,00	2,9	2,5	4,0	4,6	3,9	3,8	9,9
Me-C19:1	18,08	1,3	0,4	1,0	0,3	0,1	0,3	
Me-C19:1	18,14			2,2		3,8		
mcb 19:1	18,16	1,7	2,5	1,8	4,3		4,0	
mcb 19:0	18,38					26,3		
mcb 19:0	18,41	23,6	24,0	26,7	24,4		21,6	0,8
mcb 19:0	18,48					0,1		0,4
mcb 19:1	18,53		0,2				0,4	0,7
mcb 20?	18,55				0,3	0,2	0,4	0,4
<i>i</i> -C19:0	18,63	0,3	0,2	0,2	0,3	0,6		0,7
<i>ai</i> -C19:0	18,70	0,7	0,3	0,4	0,4	0,4		
C19:0 <sub>cy9,10</sub>	18,83	1,0	1,3		0,8	0,7		1,6
<i>n</i> -C19:1	18,87			0,8			0,9	
<i>n</i> -C19:0	19,00				0,3		1,4	0,3
C16:1Δ9/C18:1Δ11		1,5	1,4	1,5	0,5	1,9	1,0	1,4
								0,7

Fortsetzung D III Verteilung der SCFA (Gew.-%) in Demospongiae

ECL	<i>Antho dichotoma</i>	<i>Clathria barleci</i>	<i>Hymedesmitum</i> sp.	<i>D-unknawn</i> sp.-1	<i>D-unknawn</i> sp.-2	<i>Forcepia forcipis</i>	<i>Mycale lingua</i>	<i>Oceanapia robusta</i>	<i>Haliclona</i> sp.-1	<i>Haliclona</i> sp.-2	<i>Haliclona urceolus</i>	<i>Petrosia crassa</i>	<i>Hemigellius puniceus</i>	
<i>n</i> -C12:0	12,00													
<i>i</i> -C13:0	12,63				1,3				0,2			0,1		
<i>ai</i> -C13:0	12,70								0,2					
<i>n</i> -C13:0	13,00								0,1	0,3				
<i>i</i> -C14:0	13,63								0,4			0,3		
<i>n</i> -C14:0	14,00	3,7	3,4	1,6	4,2	5,2	1,6	3,0	1,4	1,9	3,7	2,8	1,3	5,0
3-Me-C15:0	14,36								0,2	0,4			0,4	
Trimethyltridecansäure	14,47				12,5									
mcb 15:0	14,47								1,1	2,2			3,0	
<i>i</i> -C15:0	14,63	1,6	2,6	2,1	1,6	2,4	1,0	1,5	7,3	6,3	7,8	17,6	5,1	6,1
<i>ai</i> -C15:0	14,70		1,3		1,4	0,5			4,6	4,3	0,3	3,1	4,3	0,4
<i>n</i> -C15:1	14,83					0,2								
<i>n</i> -C15:1	14,92									0,1				
<i>n</i> -C15:0	15,00	2,1	1,2	0,8	1,3	1,3	0,8	0,8	0,6	0,8	0,9	2,0	0,7	1,1
Dime-C16:0	15,06								2,8	1,6			1,8	
mcb16:1	15,31									0,2			0,4	
3-Me-C16:0	15,36								0,2	0,3				
mcb 16:0	15,46								0,4	1,4			1,4	
mcb 16:0	15,56	0,3				0,2								
<i>i</i> -C16:0	15,63	1,4	1,3	1,5	1,5	2,2	1,1	1,8	0,6	1,0	1,4	5,1	0,8	1,1
<i>ai</i> -C16:0	15,71	1,8	1,3			1,8	0,5	1,0	0,7	0,9	0,8	1,3		1,8
<i>n</i> -C16:1 (Δ9)	15,76	11,5	11,3	13,8	12,1	5,1	4,2	10,4	4,5	7,3	15,2	5,8	10,9	12,4
<i>n</i> -C16:1	15,81	0,4					0,9				1,5	0,5		0,5
<i>n</i> -C16:1	15,86	0,8			1,3	0,5			1,3	2,1			2,5	
<i>n</i> -C16:0	16,00	22,3	16,0	27,7	23,6	24,6	27,1	18,1	4,9	4,4	24,0	25,7	5,3	21,7
Dime-C17:0	16,05									0,2				
Me-C17:2	16,12								0,1	0,2			0,2	
Me-17:1?	16,21	1,6					3,0	1,3	0,3	0,7			0,5	
mcb17:1	16,27		2,4											
mcb17:1	16,31					0,2								
mcb17:1	16,35	0,6		1,0		0,4			2,6	6,2	0,3		5,2	
mcb 17:0	16,40					0,6			13,9	12,5			12,3	13,7
mcb 17:0	16,45										1,3	1,0		
mcb 17:0	16,48						5,3							
Dimethylacetal	16,48				1,2									
mcb 17:0	16,51										0,8			
<i>n</i> -C17:1	16,52	3,5	7,4	0,3										
mcb 17:0	16,58	0,4		1,1	0,4	0,9	1,3		0,9	0,8			0,9	0,5
<i>i</i> -C17:0	16,63	2,4	2,0	5,0	2,9	2,3	2,6	2,2	0,3	0,6	0,7	2,1	0,5	0,8
<i>ai</i> -C17:0	16,70	2,1	1,7	1,9	2,3	1,6	7,5	3,6	2,5	2,9	3,6	10,0	1,8	1,9
C17:0cyc9,10	16,82	1,1		14,3	3,1	10,3		1,5	0,3	0,3	18,8	0,6	0,5	0,7
<i>n</i> -C17:1	16,88	0,5	1,7	2,2			1,4			0,1			0,2	
α-MeO-C16:1	16,89					1,3								
<i>n</i> -C17:0	17,00	1,4	2,2	1,7	3,1	0,7		1,8	0,3	0,4	1,3	1,2	0,3	0,5
mcb 18:0	17,40	0,4		0,6					0,7	1,2			0,8	
mcb 18:0	17,42													0,3
Dimethylacetal	17,48				0,7									
PUFA	17,49													
PUFA	17,54				0,9	0,5								
mcb 18:0	17,57	3,3	3,3	0,7	1,8	0,7	2,0	2,2			1,9	2,1		0,5
Phytansäure	17,64	5,0							0,1		1,4			
<i>n</i> -C18:1	17,70						7,5	5,1				2,9		7,6
<i>ai</i> -C18:0	17,71				5,9	5,9			0,3	0,8				1,2
<i>n</i> -C18:1	17,77	15,9	5,3											
<i>n</i> -C18:1 (Δ11)	17,87	0,4	21,9	9,3	9,9	7,7	14,2	17,7	1,3	2,2	8,9	9,1	3,4	3,4
<i>n</i> -C18:0	18,00	7,7	7,7	6,0	9,5	2,7	9,8	15,1	3,2	3,7	3,3	4,4	3,8	10,9
Me-C19:1	18,08								2,7	1,2				
Me-C19:1	18,14								3,7	1,9				
mcb 19:1	18,16									1,6			4,8	
mcb 19:0	18,38		2,8	2,4	5,2		2,9					1,0		2,4
mcb 19:0	18,40					2,2		3,5	28,1	24,2	0,4		22,9	
mcb 19:1	18,41	3,9												
Dimethylacetal	18,47				0,6		0,8							
mcb 19:0	18,50									0,1				
mcb 19:0	18,55	0,8		2,8	3,1		0,8			0,3	0,6		0,3	
mcb 19:0	18,58					1,8								
α-MeO-C18:2	18,63							7,1						
<i>i</i> -C19:0	18,63	0,9								0,2				0,8
<i>ai</i> -C19:0	18,70		0,7		0,4				1,3	0,2	0,6		0,5	0,4
Dimethylacetal	18,71					0,2	0,4							
C19:0cyc9,10	18,83	0,6		0,7	0,4		1,8			0,2	0,8		0,8	0,4
<i>n</i> -C19:1	18,87		1,6			0,8							0,9	
<i>n</i> -C19:0	19,00	0,9	1,1	1,0	1,6		1,7	3,7						1,6
C16:1Δ9/C18:1Δ11		0,7	0,5	1,5	1,2	0,6	0,2	0,6	3,5	3,3	1,7	0,6	3,2	1,6

## Fortsetzung D III Verteilung der SCFA (in Gew.-%) in Demospongiae

ECL		<i>Phakellia</i> <i>robusta</i>	<i>Axinella</i> <i>infundibulif.</i>	<i>Spongosorites</i> <i>genitrix</i>	<i>Hymeniacidon</i> <i>aff. fallax</i>	<i>Dendrilla</i> <i>cirsioides</i>	<i>D-unknown</i> sp. 3	<i>D-unknown</i> sp. 4	<i>D-unknown</i> sp. 5
<i>i</i> -C13:0	12,63	0,3		0,1					
<i>ai</i> -C13:0	12,70	0,2		0,1					
<i>n</i> -C13:0	13,00	0,3		0,1					
<i>i</i> -C14:0	13,63	1,2		0,4					0,7
<i>n</i> -C14:0	14,00	9,7	2,2	1,9	3,5	4,7	5,3	7,8	5,1
3-Me-C15:0	14,36			0,5					
mcb 15:0	14,47			1,8					
<i>i</i> -C15:0	14,63	2,8	0,6	4,7	1,3	10,0	13,1	10,5	31,0
<i>ai</i> -C15:0	14,70	1,6	0,8	3,7		0,8	2,7	2,5	1,8
<i>n</i> -C15:1	14,92			0,1					
<i>n</i> -C15:0	15,00	1,1	0,6	1,4	1,1	1,0	2,6	1,6	1,9
Dime-C16:0	15,06			1,5					
3-Me-C16:0	15,36			0,6					
mcb 16:0	15,39		0,5			0,3			
mcb 16:0	15,46			1,7					
Dimethylacetal	15,50						0,8		
mcb 16:0	15,56				0,7				
<i>n</i> -C16:2	15,56			0,1					
PUFA	15,57	0,9							
<i>i</i> -C16:0	15,63	1,5	1,8	0,8	2,0	4,7	6,2	3,5	3,9
<i>ai</i> -C16:0	15,71		2,7		0,7	2,9	4,1	2,8	4,4
<i>n</i> -C16:1 (Δ9)	15,76	31,6	6,6	8,5		2,3	3,5		2,7
<i>n</i> -C16:1	15,79				13,1			3,7	
<i>n</i> -C16:1	15,86		0,5	2,4	0,8	0,6	0,9		0,5
<i>n</i> -C16:0	16,00	17,8	15,0	4,9	22,6	9,4	14,8	21,5	16,2
Me-C17:2	16,12			0,3					
mcb 17:1	16,35			7,3		0,3	0,8		
mcb 17:0	16,40				0,8				0,5
mcb 17:0	16,43			8,6		0,3			
mcb 17:0	16,45		1,5						
mcb 17:0	16,47	1,0					1,5		
mcb 17:0	16,51		9,1						
mcb 17:0	16,56		0,6	2,5		0,4			
mcb 17:0	16,58						1,0		0,4
<i>i</i> -C17:0	16,63	0,2	1,8			2,6	8,0	3,4	3,8
<i>ai</i> -C17:0	16,70		2,7	1,2	4,5	1,7	3,8	3,0	0,7
C17:0cyc9,10	16,82	5,0	2,0	0,6	3,5	0,2		1,1	0,8
<i>n</i> -C17:1	16,88			0,2			5,9		
<i>n</i> -C17:0	17,00	0,5	0,8	0,7	2,1	0,4	2,0	1,7	0,6
mcb 18:1	17,35		0,4						
mcb 18:0	17,40			0,9					
<i>n</i> -C18:2	17,50		2,4	1,3		31,4			1,2
<i>n</i> -C18:2	17,53			2,9					
PUFA	17,54	2,3			7,6				
mcb 18:0	17,56		1,3						
mcb 18:0	17,57							2,4	
<i>i</i> -C18:0	17,63		2,7						
Phytansäure	17,64	11,1			4,7	1,5			1,7
<i>n</i> -C18:1	17,70			1,7		2,5			
<i>ai</i> -C18:0	17,71		8,3				5,3	4,4	
<i>n</i> -C18:1 (Δ11)	17,77	6,0	7,3	3,9	16,5	9,0	8,4	15,6	19,1
<i>n</i> -C18:1	17,87		0,3	0,1		0,3			
<i>n</i> -C18:0	18,00	3,4	4,5	3,2	7,6	4,1	2,0	9,8	1,1
Me-C19:1/Me-C19:2	18,11			9,1					
mcb 19:1	18,38		6,6						
mcb 19:0	18,38	0,3			4,9	1,7			0,5
mcb 19:0	18,43			16,9					
<i>n</i> -C19:2	18,46					1,1			
mcb 19:0	18,55		7,5			2,4			0,7
mcb 19:0	18,58						4,2	2,9	
<i>i</i> -C19:0	18,63	0,3		0,5	1,0				
<i>ai</i> -C19:0	18,70	0,2	0,4	0,3		0,6	0,8	0,8	
C19:0cyc9,10	18,83	0,2	2,3	1,4	1,1	1,4			0,4
<i>n</i> -C19:1	18,87						0,8	1,0	
<i>n</i> -C19:0	19,00	0,4	1,2			0,3	0,6		
C16:1Δ9/C18:1Δ11		5,3	0,9	2,1	0,8	0,3	0,4	0,2	0,1

Fortsetzung D III Verteilung der SCFA-Substanzklassen in Demospongiae

	<i>Strophnus ponderosus</i>	<i>Dragmastra normanni</i>	<i>Geodia barretti</i>	<i>Geodia macandrewii</i>	<i>Geodia phlegraei</i>	<i>Pachymatisma johnstonii</i>	<i>Thenea muricata</i>	<i>Tentorium semisuberites</i>
Σ <i>n</i> -SCFA	9,6	9,2	9,4	13,6	11,9	11,0	38,8	17,7
Σ monoen-SCFA	14,5	15,4	17,3	15,4	12,4	18,8	19,9	17,1
Σ dien-SCFA	9,6	7,9	2,8	1,2	2,4	1,7		19,2
Σ terminal verzweigte SCFA	15,9	14,5	15,1	14,0	14,4	14,5	21,0	16,0
Σ mittl. verzweigte SCFA	46,7	47,4	52,6	52,2	54,1	51,6	3,6	5,2
Σ dimethylverzweigte SCFA		1,4	1,5	1,2	1,3	1,4		7,7
Σ 3-Methylverzweigte SCFA		0,1	0,1		0,1	0,2		0,4
Σ cyclopropyl-SCFA				1,1	1,1			13,9

	<i>Antho dichotoma</i>	<i>Clathria bartleii</i>	<i>Hymedes. sp.</i>	<i>D-unknown sp. 1</i>	<i>D-unknown sp. 2</i>	<i>Forcepia forcepisp</i>	<i>Mycate lingua</i>	<i>Oceanapia robusta</i>	<i>Haliclona sp. 1</i>	<i>Haliclona sp. 2</i>	<i>Haliclona urceolus</i>	<i>Petrosia crassa</i>	<i>Hemigellius pumiceus</i>
Σ <i>n</i> -SCFA	38,2	31,5	38,7	43,3	34,4	40,9	42,5	10,3	11,3	33,6	36,1	11,4	40,7
Σ monoen-SCFA	29,5	41,7	25,4	23,4	14,8	27,3	34,2	7,0	11,8	25,6	18,3	18,0	23,8
Σ dien-SCFA			1,6			0,9	2,2	0,5	0,2		0,8	0,3	1,1
Σ terminal verzweigte SCFA	10,1	10,9	10,5	16,0	18,0	12,6	12,6	16,2	18,1	15,2	39,3	14,7	13,4
Σ mittl. verzweigte SCFA	11,4	8,5	8,6	10,4	6,9	15,1	7,1	54,6	54,8	4,6	4,1	52,6	17,4
Σ 3-Methylverzweigte SCFA								0,4	0,7			0,4	1,5
Σ dimethylverzweigte SCFA								2,8	1,8			1,8	
Σ a-MeOH-SCFA			15,0	3,5	1,3	1,8	1,5	7,1	1,1	18,8	1,4	0,5	1,0
Σ cyclopropyl-SCFA	1,7			2,5	0,2	1,3		0,6					
Σ Plasmalogene													

	<i>Phakellia robusta</i>	<i>Axinella infund.</i>	<i>Spongosorites genitrix</i>	<i>Hymeniacidon aff. fallax</i>	<i>Dendrilla cirsiodes</i>	<i>D-unknown sp. 3</i>	<i>D-unknown sp. 4</i>	<i>D-unknown sp. 5</i>
Σ <i>n</i> -SCFA	33,3	24,2	12,2	36,8	19,9	27,3	42,4	25,0
Σ monoen-SCFA	37,6	14,7	17,1	30,4	14,7	19,5	24,7	22,4
Σ cyclopropyl-SCFA	5,2	4,3	2,0	4,6	1,6		1,1	1,2
Σ terminal verzweigte SCFA	8,3	21,9	11,8	9,5	23,2	44,0	26,6	46,2
Σ mittl. verzweigte SCFA	1,3	27,4	50,0	6,4	5,7	7,4	5,3	2,2
Σ dimethylverzweigte SCFA			1,5					
Σ 3-Methylverzweigte SCFA			1,0					
Σ dien-SCFA		2,4	4,4		32,5			1,2
Σ a-MeOH-SCFA						0,8		
Σ Plasmalogene								

## D IV Verteilung der SCFA (in Gew.-%) in Hexactinellida

ECL	<i>Suaresocoryptus</i> sp.	<i>Acanthasacus</i> sp.	<i>H-unknown</i> sp. 1	<i>Autosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>	<i>H-unknown</i> sp. 2	<i>Sympagella</i> cf. <i>max</i>	<i>Sympagella</i> sp. nov.	<i>Euplectella</i> sp.	<i>H-unknown</i> sp. 3	<i>H-unknown</i> sp. 4	<i>H-unknown</i> sp. 5	<i>H-unknown</i> sp. 6
<i>n</i> -C12:0 12,00	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3		0,2	0,2		0,1	0,1
<i>i</i> -C13:0 12,63	0,2	0,2		0,1	0,2	0,2						
<i>ai</i> -C13:0 12,70		0,1	0,3			0,1			0,2			
<i>n</i> -C13:0 13,00		0,2	0,2			0,2						
Me-C13:0 13,38					0,4							
<i>i</i> -C14:0 13,63	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,3		0,1		0,1		0,1
<i>ai</i> -C14:0 13,70	0,1			0,1								
<i>n</i> -C14:1 13,76						0,1						
<i>n</i> -C14:1 13,86	0,1					0,2						
<i>n</i> -C14:0 14,00	3,8	4,3	2,9	3,0	3,0	4,0	1,6	1,7	0,9	1,2	3,1	3,8
mcb-C15:1 14,35				1,4	0,1	0,5						0,1
mcb-C15:0 14,45	0,9	1,6	1,6	0,9	0,4	1,1		0,5	2,0		0,2	1,6
<i>i</i> -C15:0 14,63	0,8	0,5	0,5	1,0	0,8	1,1	0,7	0,5	1,6	0,7	1,0	0,6
<i>ai</i> -C15:0 14,70	0,6	0,5	1,0	0,8	0,7	1,1	2,5	0,2		0,5	0,5	0,5
Dimethylacetal 14,76	0,1											
<i>n</i> -15:1 14,82	0,1	0,1	0,2									
<i>n</i> -C15:0 15,00	0,7	0,7	0,9	0,7	0,8	1,1	0,6	1,1	0,2	0,8	1,4	1,0
Dime-C16:0 15,08												0,2
mcb 16:0 15,44			0,1	0,1								
mcb 16:0 15,57		0,1		0,1	0,1	0,1						
<i>i</i> -C16:0 15,63	0,4	0,3	0,7	0,9	0,5	1,0		0,6	0,1	0,9	1,0	0,6
<i>ai</i> -C16:0 15,71				0,4	0,2	0,4				0,2	0,5	
<i>n</i> -C16:1 15,74			0,5									
<i>n</i> -C16:1 (Δ9) 15,76	9,0	12,5	2,2	5,2	6,3	4,3	5,0	9,4	7,6	0,9	5,9	2,9
<i>n</i> -C16:1 15,81				0,1				0,3			0,2	0,1
<i>n</i> -C16:1 15,86	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5		0,2	0,2	0,2	0,7	0,2
<i>n</i> -C16:0 16,00	11,3	15,9	12,7	9,6	11,2	11,8	11,9	18,2	6,0	5,2	22,4	27,9
mcb 17:1 16,25					0,1	0,2						
mcb 17:1 16,35				0,1	0,2	0,2				0,3		
mcb 17:0 16,42	0,3	0,2	0,7	0,4	0,4	0,6		0,3	1,4	0,4	1,4	0,3
Dimethylacetal 16,49			0,5		0,9							0,3
mcb 17:0 16,56		0,1		0,2				0,1				
<i>i</i> -C17:0 16,63	0,5	0,4	0,7	0,5	0,6	1,7	1,0	0,7	0,4	1,0	2,3	0,9
<i>ai</i> -C17:0 16,70	0,6	1,2	1,9	1,3	0,8	2,0	2,8	2,4	0,6	1,9	1,8	1,8
<i>n</i> -C17:1 16,76	0,5											
C17:0cyc9,10 16,82	1,9	0,8	0,7	0,8	1,8	1,7	0,9	0,4	0,5	0,3	2,9	0,4
<i>n</i> -C17:0 17,00	1,6	1,1	2,9	1,4	1,8	2,9	1,8	1,2	1,1	1,9	2,4	5,0
Dimethylacetal 17,20								0,7			0,3	
mcb 17:0 17,43				0,1	0,2	0,1					0,2	0,1
mcb 18:0 17,55							2,7					
mcb 18:0 17,58	0,3	0,3	0,7	1,3	0,4	1,2		0,7		1,2	0,4	3,6
<i>i</i> -C18:0 17,64				0,3		5,7	0,9	0,8			0,2	1,4
<i>n</i> -C18:2 17,64	0,2		0,1		0,3							
Phytansäure 17,68			11,5	7,6	7,7				9,6			
<i>ai</i> -C18:0 17,70						5,8					7,1	
<i>n</i> -C18:1 17,71	8,3	15,0					4,4	31,1		4,5		11,9
<i>n</i> -C18:1 (Δ11) 17,77	22,4	17,8	12,2	12,1	17,7	18,2	13,1	8,5	16,6	8,5	8,4	5,6
<i>n</i> -C18:1 17,88						0,8	0,9	0,5				
<i>n</i> -C18:0 18,00	13,9	9,9	17,1	30,8	17,1	11,7	18,7	16,6	5,4	56,2	17,0	15,4
Me-C19:1 18,06		1,3										
Dimethylacetal 18,21			0,4			0,6	2,2					
PUFA 18,31					0,2	0,3						
mcb 19:0 18,39		1,1	2,6	2,5				0,3	6,8	0,6	11,4	2,8
mcb 19:0 18,43	10,0	5,8	7,6		7,5	6,1	16,1		29,1			
Dimethylacetal 18,48		0,3									0,2	4,2
mcb 19:0 18,58		0,3				1,1				0,4	0,2	0,1
<i>i</i> -C19:0 18,63	0,3		0,8	1,5	0,2	0,1	3,0	0,3	0,2			0,3
<i>ai</i> -C19:0 18,71					0,1	5,6	2,4	1,0				1,2
<i>n</i> -C19:1 18,73											0,6	
<i>n</i> -C19:2 18,76		0,9	1,9									
<i>n</i> -C19:1 18,77	1,6				0,8					1,1		
C19:0cyc9,10 18,83	3,9	1,6	2,1	4,6	4,2	3,9	4,1	1,3	2,6	3,6	2,4	1,4
<i>n</i> -C19:0 19,00	1,3	1,0	2,2	1,3	1,8	0,4	0,9	0,2		0,9	0,2	1,5
C16:1Δ9/C18:1Δ11	0,4	0,7	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,5	0,5	0,1	0,7	0,5



## Fortsetzung D IV Verteilung der SCFA (in Gew.-%) in Hexactinellida

	ECL	<i>Farrea</i> (?) sp.	<i>Ipheton panicea</i>	<i>Heterochone</i> sp.	<i>H-unknown</i> sp. 7	<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	<i>Hyalonema</i> sp. 2	<i>H-unknown</i> sp. 8	<i>H-unknown</i> sp. 9
	<i>i</i> -C12:0	11,63						0,2	
	<i>n</i> -C12:0	12,00	0,1	0,2	1,1	0,2	0,2	0,5	0,3
	<i>i</i> -C13:0	12,63	0,2				0,1		0,1
	<i>ai</i> -C13:0	12,70					0,1		0,2
	<i>n</i> -C13:0	13,00	0,1		0,2			0,1	0,1
	3-OH-C12:0	13,38			0,2				
	<i>i</i> -C14:0	13,63	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1		0,2
	<i>ai</i> -C14:0	13,70			0,1				
	<i>n</i> -C14:1	13,76							0,6
	<i>n</i> -C14:1	13,86							0,3
	<i>n</i> -C14:0	14,00	3,8	4,8	3,8	4,0	1,6	2,0	3,4
	3-Me-C15:0	14,37				0,4			3,3
	mcb 15:0	14,45		0,6					
	Trimethyltridecansäure	14,49							
	<i>i</i> -C15:0	14,63	2,8	1,1	3,1	3,1	1,8	9,7	7,9
	<i>ai</i> -C15:0	14,70	0,6	0,5	0,8	0,5	5,1	0,8	0,8
	Dimethylacetal	14,76					2,4	1,8	0,3
	<i>n</i> -C15:0	15,00	1,6	1,3	2,0	1,3	0,9	0,8	0,8
	dime-C16:0	15,08		0,1			0,7		
	mcb 16:0	15,37					0,2		
	mcb 16:0	15,44	0,1	0,2		0,1			0,1
	mcb 16:0	15,57	0,1						0,2
	<i>i</i> -C16:0	15,63	1,3	0,8	3,3	3,1	0,6	0,5	0,4
	<i>ai</i> -C16:0	15,70	0,6	0,3	1,4	1,4	0,2		
	<i>n</i> -C16:1	15,76	6,6	6,8	9,4	4,5	4,4	6,9	9,8
	<i>n</i> -C16:1	15,81		0,1					6,7
	<i>n</i> -C16:1	15,86	7,3	0,7	3,4	7,0	0,3		0,2
	<i>n</i> -C16:0	16,00	16,7	26,0	17,5	11,0	4,3	14,8	12,6
	mcb 17:1	16,35	0,2	0,1	0,1	0,1	6,9	0,5	0,5
	mcb 17:0	16,42	0,8	2,0	0,7		4,6	0,7	0,1
	mcb 17:0	16,44				0,6		0,8	
	Dimethylacetal	16,49							0,2
	mcb 17:0	16,56		0,4	0,3				0,4
	<i>i</i> -C17:0	16,63	1,5	1,7	0,9	0,9	2,3	0,8	0,5
	<i>ai</i> -C17:0	16,70	1,9	1,6	4,7		1,5	1,9	
	<i>n</i> -C17:1	16,72				3,7			0,7
	<i>n</i> -C17:1	16,76							
	C17:0 <sub>cy9,10</sub>	16,82	2,1	1,8	1,2	1,3	0,1	5,7	3,6
	<i>n</i> -C17:1	16,88					0,4		5,1
	<i>n</i> -C17:1	16,93							
	<i>n</i> -C17:0	17,00	0,8	2,2	2,3	1,4	0,8	1,7	0,8
	$\alpha$ -MeO-C16:0	17,25	1,3						1,4
	mcb 18:0	17,43		0,3			0,6		
	mcb 18:1	17,48	0,4	1,2	0,4	1,4			
	mcb 18:0	17,51	0,3						
	mcb 18:0	17,58	0,3	0,3	0,3	0,3		0,9	0,1
	<i>i</i> -C18:0	17,63					0,7	1,1	0,3
	<i>n</i> -C18:2	17,64		0,6	0,8	0,8			0,6
	<i>ai</i> -C18:0	17,70	11,2	8,1	9,6			14,1	11,9
	<i>n</i> -C18:1	17,71				9,3	1,2		7,3
	<i>n</i> -C18:1	17,77	4,2	4,9	6,4	2,1	2,3	6,3	7,1
	<i>n</i> -C18:1	17,88						3,8	3,4
	<i>n</i> -C18:0	18,00	23,5	17,8	16,8	24,8	7,1	14,8	17,8
	Me-C19:1	18,06					1,3		0,2
	Me-C19:1	18,18					2,5		
	mcb 19:0	18,24							
	mcb 19:0	18,39	1,3	9,0	1,7				0,5
	mcb 19:0	18,43				2,3	32,2	5,1	1,8
	mcb 19:0	18,58	0,7	0,1	0,4	0,5		0,7	2,3
	<i>i</i> -C19:0	18,63	0,5	0,1	0,4	0,7	4,9	0,4	0,8
	<i>ai</i> -C19:0	18,71		0,5	3,7	3,5	4,1	0,9	4,4
	Dimethylacetal	18,75							
	<i>n</i> -C19:2	18,76	0,7						1,5
	C19:0 <sub>cy9,10</sub>	18,83	0,8	1,2	0,6	1,1	1,1	1,8	5,2
	<i>n</i> -C19:0	19,00	4,4	0,1	2,0	3,2	0,3	0,5	1,4

## Fortsetzung D IV Verteilung der SCFA-Substanzklassen in Hexactinellida

	<i>Staurocylptus</i> sp.	<i>Acanthascus</i> sp.	<i>H-unknown</i> sp. 1	<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukurii</i>	<i>H-unknown</i> sp. 2	<i>Sympagella</i> cf. <i>max</i>	<i>Sympagella</i> sp. nov.	<i>Euplectella</i> sp.	<i>H-unknown</i> sp. 3	<i>H-unknown</i> sp. 4	<i>H-unknown</i> sp. 5	<i>H-unknown</i> sp. 6
$\Sigma n$ -SCFA	32,8	33,4	39,3	47,0	35,8	32,4	35,4	39,3	13,8	66,1	46,6	54,7
$\Sigma$ monoen-SCFA	42,4	45,8	15,6	17,7	25,3	24,2	23,5	50,0	24,4	15,1	15,7	20,7
$\Sigma$ dien-SCFA	0,2	0,9	2,0		0,3							3,3
$\Sigma$ terminal verzweigte SCFA	3,6	3,3	6,2	6,9	4,4	25,1	13,3	6,5	3,0	5,3	14,4	7,4
$\Sigma$ mittkettig verzweigte SCFA	11,6	10,9	13,3	7,0	9,9	11,1	18,8	2,0	39,3	2,8	13,9	8,7
$\Sigma$ dimethyl verzweigte SCFA												0,2
$\Sigma$ cyclopropyl-SCFA	5,8	2,4	2,8	5,4	6,0	5,5	5,0	1,7	3,1	3,9	5,3	1,9
$\Sigma$ Plasmalogene	0,1	0,3	0,9		0,9	0,6	2,9			0,2	0,3	4,5

	<i>Farrea</i> (?) sp.	<i>Ipheton</i> <i>panicea</i>	<i>Heterochone</i> sp.	<i>H-unknown</i> sp. 7	<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	<i>Hyalonema</i> sp. 2	<i>H-unknown</i> sp. 8	<i>H-unknown</i> sp. 9
$\Sigma n$ -SCFA	51,0	52,3	45,6	45,9	15,2	35,0	37,3	30,5
$\Sigma$ monoen-SCFA	18,1	12,4	19,2	27,7	8,3	13,2	17,6	18,3
$\Sigma$ dien-SCFA	0,7	0,6	0,8	0,8				2,9
$\Sigma$ terminal verzweigte SCFA	20,7	14,6	28,3	13,3	22,2	22,5	19,8	18,3
$\Sigma$ mittkettig verzweigte SCFA	4,3	13,7	4,0	5,6	48,5	8,2	5,1	9,4
$\Sigma$ 3-Methyl verzweigte SCFA					0,4			
$\Sigma$ dimethyl verzweigte SCFA		0,1			0,7			0,2
$\Sigma$ cyclopropyl-SCFA	2,9	3,0	1,8	2,4	1,2	7,5	8,8	8,1
$\Sigma$ Plasmalogene								2,1

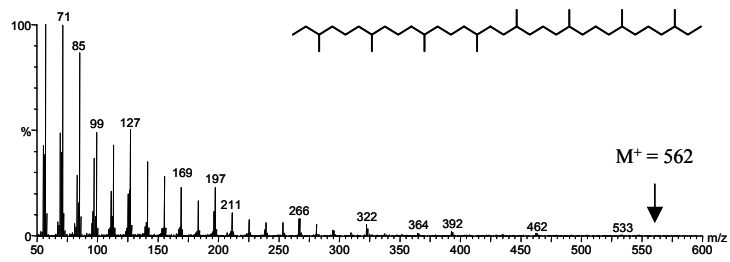
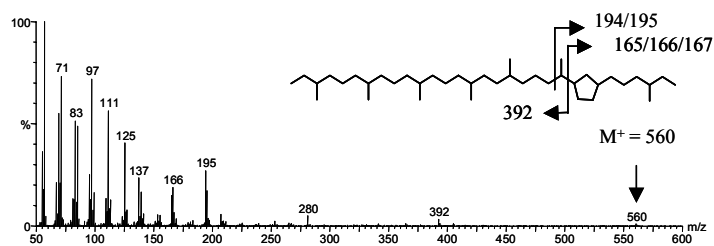
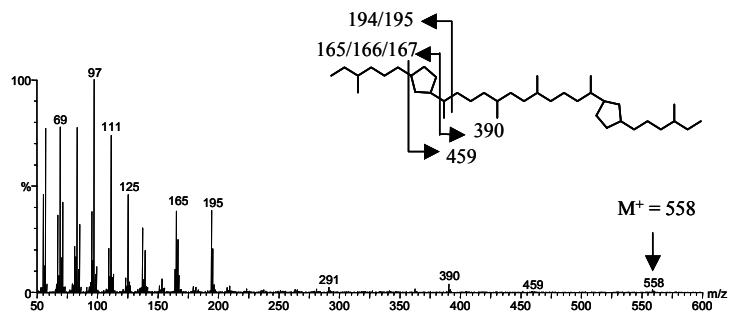
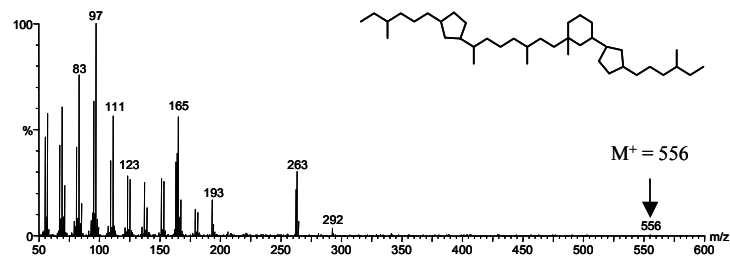
### D V Gew.-Verhältnisse SCFA/LCFA sowie Anteile der SCFA am FA-Inventar in Demospongiae

x [Σ LCFA] <sup>-1</sup>	Astrophorida							Hadrom.
	<i>Stryphnus ponderosus</i>	<i>Dragmastra normanii</i>	<i>Geodia barretti</i>	<i>Geodia macandrewii</i>	<i>Geodia phlegraei</i>	<i>Pachymatisma johnstonii</i>	<i>Thenea muricata</i>	<i>Tentorium semisaberites</i>
Σ n-SCFA	0,13	0,10	0,20	0,17	0,13	0,20	0,07	0,06
Σ monoen-SCFA	0,22	0,19	0,38	0,20	0,14	0,35	0,04	0,09
Σ ilai-SCFA	0,21	0,16	0,32	0,17	0,16	0,27	0,04	0,05
Σ mcb-SCFA	0,61	0,51	1,13	0,64	0,58	0,94	0,01	0,02
Gew.-% Σ SCFA an Σ FA	30,0	23,6	34,5	27,2	25,0	32,2	7,3	11,6

x [Σ LCFA] <sup>-1</sup>	Poecilosclerida						
	<i>Antho dichotoma</i>	<i>Clathria bartlei</i>	<i>Hymedesmium</i> sp.	<i>D-unknown</i> sp.1	<i>D-unknown</i> sp. 2	<i>Forcepia forcipis</i>	<i>Mycate lingua</i>
Σ n-SCFA	0,08	0,05	0,10	0,16	0,15	0,42	0,04
Σ monoen-SCFA	0,06	0,06	0,10	0,10	0,11	0,35	0,03
Σ ilai-SCFA	0,02	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,01
Σ mcb-SCFA	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,11	0,00
Gew.-% Σ SCFA an Σ FA	34,2	6,4	33,5	13,2	15,2	6,4	4,1

x [Σ LCFA] <sup>-1</sup>	Haplosclerida					
	<i>Oceanapia robusta</i>	<i>Haliclona</i> sp. 1	<i>Haliclona</i> sp. 2	<i>Haliclona urceolus</i>	<i>Petrosia crassa</i>	<i>Hemigellius puniceus</i>
Σ n-SCFA	0,09	0,12	0,07	0,05	0,09	0,08
Σ monoen-SCFA	0,06	0,14	0,09	0,03	0,14	0,05
Σ ilai-SCFA	0,14	0,18	0,03	0,06	0,11	0,03
Σ mcb-SCFA	0,43	0,54	0,01	0,01	0,38	0,04
Gew.-% Σ SCFA an Σ FA	46,2	51,5	17,2	6,5	47,4	17,3

x [Σ LCFA] <sup>-1</sup>	Halichondrida				Dendroceratida				
	<i>Phakellia robusta</i>	<i>Axinella infundibuliformis</i>	<i>Spongosorites genitrix</i>	<i>Hymeniacidon</i> aff. <i>fallax</i>	<i>Dendrilla cirsioides</i>	<i>D-unknown</i> sp. 3	<i>D-unknown</i> sp. 4	<i>D-unknown</i> sp. 5	
Σ n-SCFA	0,79	0,06	0,16	0,04	0,07	0,10	0,11	0,10	
Σ monoen-SCFA	1,01	0,05	0,24	0,03	0,05	0,07	0,07	0,02	
Σ ilai-SCFA	0,20	0,06	0,15	0,01	0,08	0,54	0,07	0,17	
Σ mcb-SCFA	0,03	0,08	0,48	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
Gew.-% Σ SCFA an Σ FA	76,8	20,6	55,8	9,9	25,7	29,6	20,6	29,2	

Acyclisches Biphytan C<sub>40</sub> 0Monocyclisches Biphytan C<sub>40</sub> IBicyclisches Biphytan C<sub>40</sub> IITricyclisches Biphytan C<sub>40</sub> III aus *Aulosaccus* cf. *mitsukuri* (Hexactinellida)

Volker Thiel · Martin Blumenberg · Jens Hefter  
Thomas Pape · Shirley Pomponi · John Reed  
Joachim Reitner · Gert Wörheide · Walter Michaelis

## A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges

Received: 15 December 2000 / Accepted: 24 October 2001 / Published online: 10 January 2002  
© Springer-Verlag 2002

**Abstract** Hexactinellid sponges are often considered to be the most ancient metazoans. Lipid biomarkers from 23 species were studied for information on their phylogenetic properties, particularly their disputed relation to the two other sponge classes (Demospongiae, Calcarea). The most prominent lipid compounds in the Hexactinellida comprise  $C_{28}$  to  $C_{32}$  polyenoic fatty acids. Their structures parallel the unique patterns found in demosponge membrane fatty acids ('demospongiic acids') and strongly support a close phylogenetic association of the Demospongiae and the Hexactinellida. Both taxa also show unusual mid-chain methylated fatty acids ( $C_{15}$ – $C_{25}$ ) and irregular  $C_{25}$ - and  $C_{40}$ -isoprenoid hydrocarbons, tracers for specific eubacteria and Archaea, respectively. These biomarkers indicate a similar, highly conservative symbiont community, although some shift in the abundance of the associated microbiota was observed. The lack of these features in calcareous sponges further contradicts the still common view that Calcarea and Demospongiae are more closely related to each other than either is to the Hexactinellida.

### Introduction

It is now well established that the Porifera (sponges) are true animals. Their basic mode of organization and their biochemical properties place them at the very base of the kingdom Metazoa. A characterization as ancestral organisms seems particularly valid for the 450–500 species of the class Hexactinellida (see Hooper 2000). These sponges are considered to be an early branch within the Porifera, characterized by 'hexactine' siliceous spicules and a unique mode of soft body organization. Much of their tissue consists of multinucleate cytoplasm ('choanosyncytium') comprising collared bodies, sharing a common nucleus and linked together by plasmic bridges (Reiswig 1979; Mackie and Singla 1983).

The general monophyly of the Porifera has been proposed, but their interclass relationships are still open to debate. Reiswig and Mackie (1983) assigned separate subphylum status for the Hexactinellida (*Symplasma*), based on their syncytial organization. Accordingly, the Calcarea (calcareous sponges) and the Demospongiae were grouped into the 'cell-bearing' subphylum *Cellularia* and, due to their common possession of a pinacoderm layer, *Pinacophora* (Reitner and Mehl 1996). Alternatively a close relationship between the Hexactinellida and the Demospongiae has been proposed, according to larval similarities and their homology in chemical spicule composition (Böger 1988).

During the last decade, molecular approaches have contributed significantly to understanding sponge phylogeny, although conflicting data have not resolved early metazoan evolution. Based on amino acid sequence data, Müller (1997) calculated that the Porifera, as the first metazoan phylum, diverged from a common ancestor 0.8 Ga (1 Ga =  $10^9$  years) ago, thus extending the fossil range of these animals by more than 0.2 Ga. Studies on the composition of insulin receptor polypeptides assigned an age of 1.4 Ga to the Hexactinellida, and 1.3 Ga and 1.1 Ga for the separation of the Demospongiae and the Calcarea (Schütze et al. 1999; Skorokhod et al. 1999). A study of the protein coding gene *Hsp70* (Borchiellini et al. 1998) indicated that Demospongiae form a clade with

V. Thiel (✉) · M. Blumenberg · T. Pape · W. Michaelis  
Institut für Biogeochemie und Meereschemie,  
Universität Hamburg, Bundesstrasse 55, 20146 Hamburg,  
Germany  
e-mail: thiel@geowiss.uni-hamburg.de  
Fax: +49-40-428386347

J. Hefter  
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,  
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

S. Pomponi · J. Reed  
Division of Biomedical Marine Research,  
Harbor Branch Oceanographic Institution, 5600 US 1 North,  
Fort Pierce, FL 34946, USA

J. Reitner  
Göttinger Zentrum Geowissenschaften, Universität Göttingen,  
Goldschmidtstrasse 3, 37077 Göttingen, Germany

G. Wörheide  
Queensland Centre for Biodiversity, Queensland Museum,  
P.O. Box 3300, South Brisbane, Qld 4101, Australia

the Calcarea, excluding the Hexactinellida. However, recent gene sequence analyses supported a common Demospongiae–Hexactinellida taxon, whereas the Calcarea display closer affinities with the Ctenophora (comb jellies) than to Demospongiae (Cavalier Smith et al. 1996; Van de Peer and De Wachter 1997; Collins 1998; Adams et al. 1999; see also Zrzavy et al. 1998).

To further investigate sponge taxonomy, we conducted a study on lipid biomarkers complementary to the classical morphological and molecular biological approaches. Demosponges possess unusual membrane lipids reflecting specific enzyme systems which control biosynthetic properties such as carbon chain elongation and the introduction of distinctive double bonds. In particular, many investigations revealed the presence of unique long-chain fatty acids (LCFA, >C<sub>24</sub>) in demosponges, the so-called ‘demospongiac’ acids (see Litchfield et al. 1976; Hahn et al. 1988;

Garson et al. 1994, also see van Soest and Braekman 1999 for a review on sponge chemosystematics). These compounds provide excellent targets for chemotaxonomic analyses at the class level. However, previous lipid studies have largely focused on demosponges, and only a few studies on a limited number of species and chemical properties exist for the Hexactinellida (Bergquist et al. 1984; Lawson et al. 1984). Our study aimed to fill this gap with a comprehensive chemical view on hexactinellid lipids and their interrelationships with those of the Demospongiae and Calcarea.

## Methods

Twenty-three Hexactinellida, six Calcarea, and eight Demospongiae were studied. For species, taxonomy and sampling locations see Table 1. For sample preparation details, see Table 2 and Fig. 1.

**Table 1** Sample list, taxonomy, and sampling locations

Species/Taxonomy		Sample location	Depth (m)
<b>Hexactinellida</b>			
<i>Staurocalyptus</i> sp.	Hexasterophora	‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Punta Mangle, Galapagos 445
<i>Acanthascus</i> sp.		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Punta Vincente, Galapagos 440
Unknown sp. 1		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Gulf of Chirqui, Panama 490
<i>Rossella</i> sp. 1		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Kapp Norvegia, Eastern Weddell Sea 265
<i>Rossella</i> sp. 2		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Kapp Norvegia, Eastern Weddell Sea 265
<i>Rossella</i> sp. 3		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Kapp Norvegia, Eastern Weddell Sea 265
<i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i>		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Isla Bartholome, Galapagos 440
Unknown sp. 2		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae (?)	Santa Cruz Island, Galapagos 320
<i>Sympagella nux</i>		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae	Isla Marchena, Galapagos 380
<i>Sympagella</i> nov. sp.		‘Lyssakinosa’ – Rossellidae- (Strobiliplumicomia)	Sula-Ridge, Norway 285
<i>Euplectella</i> sp.		‘Lyssakinosa’ – Euplectellidae	Isla Marchena, Galapagos 580
Unknown sp. 3		‘Lyssakinosa’ – Euplectellidae	Plana Cay, Bahamas 860
Unknown sp. 4		‘Lyssakinosa’ – Euplectellidae	Rocas Gordon, Galapagos 430
Unknown sp. 5		‘Lyssakinosa’	Lucea, Jamaica 480
Unknown sp. 6		‘Lyssakinosa’	Tenerife, Canary Islands 335
<i>Farrea</i> (?) sp.		Hexactinosida – Farreidae	Charleston Lumps, South Carolina 215
<i>Ipheton panicea</i>		Hexactinosida – Euretidae	Turks & Caicos Islands, Caribbean 480
<i>Heterochone</i> sp.		Hexactinosida – Aphrocallistidae	Isla Marchena, Galapagos 475
Unknown sp. 7		Hexactinosida	Wolf Island, Galapagos 365
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1	Amphidiscophora	Amphidiscosida – Hyalonematidae	Negril, Jamaica 375
<i>Hyalonema</i> sp. 2		Amphidiscosida – Hyalonematidae	Long Island, Bahamas 800
Unknown sp. 8		Amphidiscosida – Hyalonematidae (?)	Negril, Jamaica 825
Unknown sp. 9		(?)	Hierro, Canary Islands 675
<b>Demospongiae</b>			
<i>Geodia barretti</i>	Tetractinomorpha	Astroforida – Geodiidae	Sula-Ridge, Norway 320
<i>Spirastrella</i> ( <i>Acanthochaetetes</i> ) <i>wellsi</i>		Hadromerida – Spirastrellidae	Osprey Reef, off Great Barrier Reef 10
<i>Haliclona</i> sp.	Ceractinomorpha	Haplosclerida – Chalinidae	Sula-Ridge, Norway 290
<i>Petrosia crassa</i>		Haplosclerida – Petrosiidae	Sula-Ridge, Norway 320
<i>Astrosclera willeyana</i>		Agelasida – Astroscleridae	Pearl Reef, Great Barrier Reef 15
<i>Agelas oroides</i>		Agelasida – Agelasidae	Banyuls sur Mer, France, Mediterranean Sea 20
<i>Phakellia ventilabrum</i>		Halichondrida – Axinellidae	Sula-Ridge, Norway 290
<i>Axinella infundibuliformis</i>		Halichondrida – Axinellidae	Sula-Ridge, Norway 320
<b>Calcarea</b>			
<i>Grantiopsis</i> sp.	Calcaronea	Leucosoleniida – Grantiidae	Wistari Reef, Great Barrier Reef 5
<i>Sycon</i> sp.		Leucosoleniida – Sycettidae	Northwest Island, Great Barrier Reef 15
<i>Leucaltis (clathria?)</i>	Calcinea	Clathrinida – Leucaltidae	Davies Reef, Great Barrier Reef 20
<i>Leucetta</i> sp.		Clathrinida – Leucettidae	Hook Island, Great Barrier Reef 5
<i>Pericharax heteroraphis</i>		Clathrinida – Leucettidae	Myrmidon Reef, Great Barrier Reef 15
<i>Levinella prolifera</i>		Clathrinida – Levinellidae	Wistari Reef, Great Barrier Reef 5

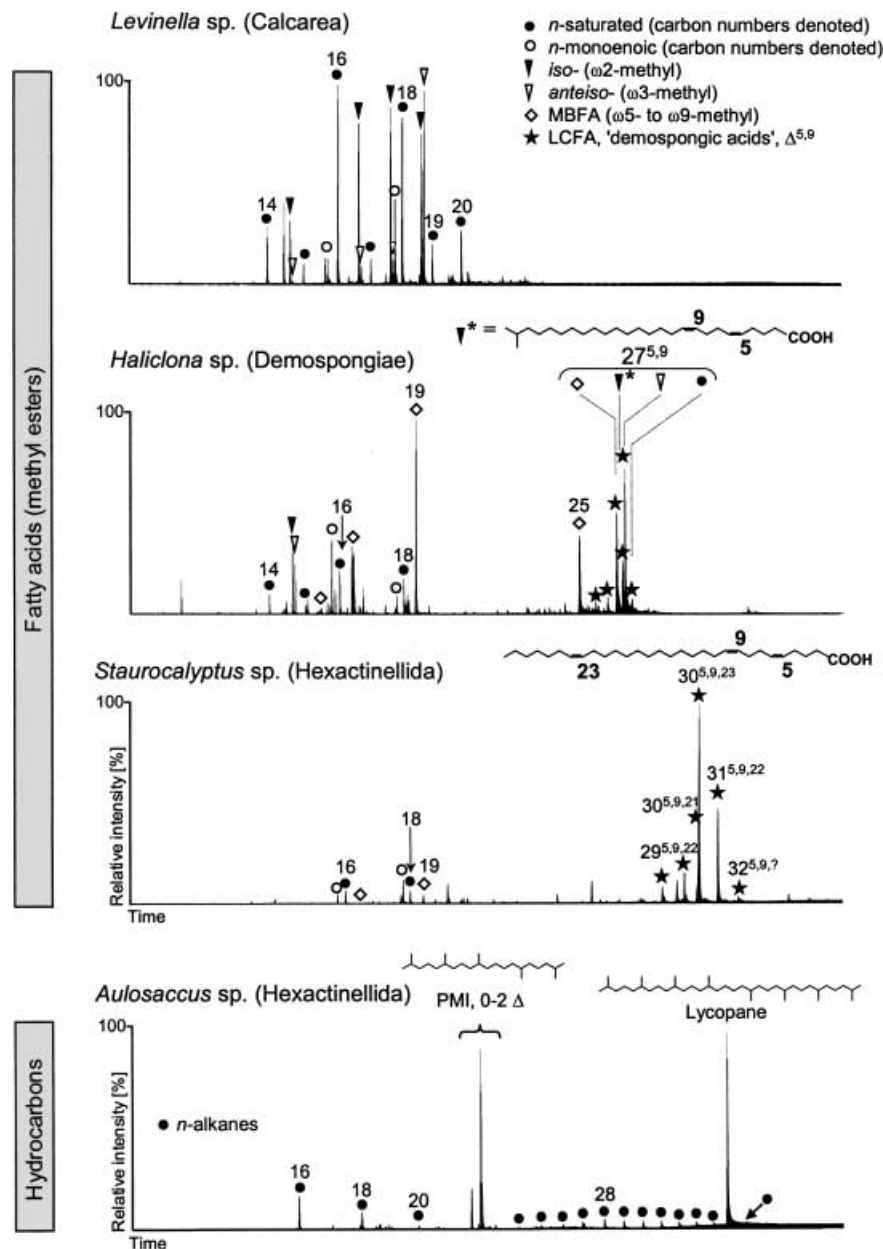
**Table 2** Presence and relative abundances of C<sub>26</sub> to C<sub>32</sub> long-chain fatty acids (LCFA). Sizes of dots refer to the relative concentrations with respect to the total amounts of C<sub>26</sub> to C<sub>32</sub> LCFA (see lowermost row). Column A Absolute concentrations (µg/g<sub>dry sponge</sub>) of the summed C<sub>30</sub> LCFA. Column B Relative proportion of C<sub>26</sub> to C<sub>32</sub> LCFA (%) in the total amount of fatty acids and sterols. △ includes isomeric mixtures of mid-chain methylated LCFA; □ tetraenoic LCFA (Δ<sup>5,9,?,?</sup>); ◇ includes brominated LCFA; n.a. not analysed; i iso (ω2-methyl) and anteiso (ω3-methyl) branched LCFA. Fatty acid methyl esters were obtained by extraction/transesterification of ~200 mg dry sponge matter with trimethylchlorosi-

lane/methanol (1:8; v/v; 2 h, 70°C), re-extraction with n-hexane vs H<sub>2</sub>O, and filtration of the n-hexane layer over silica gel with excess CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ethyl acetate (3:1; v/v). Fatty acid methyl esters were separated from the extract by elution over a 500 mg LC-NH<sub>2</sub> aminopropyl (Supelco) solid phase extraction cartridge (rinsing with 1 ml n-hexane; 4 ml n-hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3:1; v/v)). The presence of linear vs methyl branched fatty acids was checked by comparison of the GC-retention times and mass spectra of the hydrogenated products with those of reference compounds and published data. Double bond positions were determined on n-acyl-pyrrolidide derivatives (Lankelma et al. 1983)

		A B		C <sub>26</sub>		C <sub>27</sub>		C <sub>28</sub>			C <sub>29</sub>			C <sub>30</sub>			C <sub>31</sub>		C <sub>32</sub>										
				Carbon-number (C <sub>n</sub> ) and double bond position (Δ notation)																									
				?	17	19	5,9	5,9	5,9,1	17	19	5,9	5,9,23	5,9,?()	17	20	5,9	5,9,22	5,9,?()	5,9,21	5,9,23	5,9,25	5,9,?()	5,9	5,9,21	5,9,22	5,9,?	?	5,9,23
Hexactinellida																													
Hexasterophora																													
Amphidisco-phora																													
Demospongiae																													
Tetract.																													
Ceractinomorpha																													
Calcarea																													
6 species (see Table 1)		n.a. <1		Long-chain unsaturated fatty acids absent																									

● 5-15% ● 16-30% ● 31-45% ● 46-60% ● 61-100% of total LCFA

**Fig. 1** *Top* Total ion currents (TIC) of fatty acids (methyl esters) typical for the Calcarea, Demospongiae, and Hexactinellida. Note the absence of long-chain fatty acids (LCFA) in the Calcarea. *Bottom* Hydrocarbons from *Aulosaccus* sp., with 2,6,10,15,19-pentamethylcosane (PMI) derivatives and lycopane as main compounds; a common pattern found for hexactinellids. Hydrocarbons were prepared from the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:methanol extract (1:1; v/v) by elution with two-column volumes of *n*-hexane over a silica gel 60 column. Biomarkers were examined by gas-chromatography mass spectrometry (GC-MS), using a Micro-mass Quattro II spectrometer (EI, 70 eV) interfaced to a HP6890 GC with a 30 m fused silica capillary column (DB5-MS, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness). Carrier gas: He. Temperature regime: 5 min 80°C; 80°C to 310°C at 4°C min<sup>-1</sup>; 20 min 310°C; quantification via internal standard compounds



## Results

Very long carbon chains from C<sub>28</sub> to C<sub>32</sub> characterize the fatty acid moieties of all hexactinellids (Table 2). As a rule, the most prominent compounds are *n*-C<sub>30</sub> polyunsaturated carbon chains, with triaconta-5,9,23-trienoic acid (C<sub>30</sub><sup>5,9,23</sup>) and triaconta-5,9,21-trienoic acid (C<sub>30</sub><sup>5,9,21</sup>) being the most abundant. An exception was found for the Antarctic *Rossella* sp., which contain tetraenoic C<sub>29</sub> and C<sub>30</sub> LCFA (Δ<sup>5,9,?,?</sup>) as main compounds. Whereas most demosponges produce dienoic LCFA with 24–28 carbon atoms, the hexactinellid LCFA generally have more C<sub>30</sub> polyenoic acids (Fig. 1). Furthermore, in contrast to demosponges, most hexactinellids lack methyl branched carbon chains among their LCFA, although a systematic exception from this rule is found in the Hyalonematidae.

Brominated LCFA, as often observed in demosponges (Garson et al. 1994), were absent in the hexactinellids studied. No LCFA were observed in the Calcarea investigated (Table 3).

In addition to the linear saturated and C<sub>16</sub><sup>9</sup>, C<sub>18</sub><sup>9</sup> and/or C<sub>18</sub><sup>11</sup> monoenoic fatty acids, significant amounts of mid-chain branched fatty acids (MBFA) occur in both hexactinellids and demosponges (Fig. 1, Table 3). These compounds typically show a distinctive structural peculiarity, as they are characterized by isomeric mixtures of C<sub>15</sub>–C<sub>25</sub> homologues (C<sub>19</sub> predominant), with single methyl groups located between the ω5 and ω9 positions (Thiel et al. 1999). Microscopic analyses revealed a good agreement between MBFA amounts and the overall abundances of associated eubacteria in demosponges. High MBFA contents are observed for *Astrosclella will-*



**Table 3** Lipid properties of chemotaxonomic importance. *Filled circles* Significant relative amounts; *open circles* minor relative amounts; *Tr*: trace amounts; *no entry* compound or compound class

absent; *n.a.* not analysed. *LCFA* Long-chain fatty acids; *MBFA* mid-chain branched fatty acids;  $\Delta^{x,y}$  double bond position(s); *PMI* 2,6,10,15,19-pentamethylcosane; *C<sub>16</sub> $\Delta^9$*  *cis*-hexadec-9-enoic acid

		LCFA $\Delta^{5,9}$	LCFA $\Delta^{5,9}$ mid-chain branched	MBFA	LCFA $\Delta^{5,9}$ brominated	C <sub>16</sub> $\Delta^9$	PMI, PMI $\Delta$	Lycopane
Hexactinellida								
Staurocalyptus sp.	Hexasterophora	●		○		●	Tr.	●
Acanthascus sp.		●		○		●	Tr.	●
Unknown sp. 1		●		○		○	●	●
Rossella sp. 1		●	n.a.	n.a.		●	○	
Rossella sp. 2		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
Rossella sp. 3		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
Aulosaccus cf. mitsuk.		●		Tr.		○	●	●
Unknown sp. 2		●		○		●	Tr.	●
Sympagella nux		●		○		○	○	●
Sympagella nov. sp.		●		●		●	Tr.	●
Euplectella sp.		●		Tr.		●	●	●
Unknown sp. 3		●		○		○	●	●
Unknown sp. 4		●				Tr.	●	●
Unknown sp. 5		●		●		○	●	●
Unknown sp. 6		●		○		○	○	●
Farrea (?) sp.		●				○	●	●
Ipheton panicea		●		○		○	●	●
Heterochone sp.		●		○		●	●	●
Unknown sp. 7		●		○		●	●	●
Hyalonema (?) sp. 1	Amphidiscophora	●	●	●		●	○	●
Hyalonema sp. 2		●	●	○		○	●	●
Unknown sp. 8		●	●	○		●	n.a.	n.a.
Unknown sp. 9		●		○		○	○	●
Demospongiae								
Geodia barretti	Tetractinomorpha	●	●	●		●		
Spirastrella wellsi		●		Tr.		n.a.		
Haliclona sp.	Ceractinomorpha	●	●	●		●		
Petrosia crassa		●	●	●	●	●	Tr.	
Astrosclera willeyana		●		●		n.a.		
Agelas oroides		●		●	○	n.a.		
Phakellia ventilabrum		●		Tr.	●	●		
Axinella infundibulif		●		○	●	●	Tr.	●
Calcarea								
Grantiopsis (cylindr.?)	Calcaronea					○		
Sycon gelatinosum					○			
Leucaltis (clathria?)	Calcinea					○		
Leucetta sp.					○			
Pericharax heteroraph.					Tr.			
Levinella prolifera					●			

eyana (17.5% of the total fatty acids) and *Geodia barretti* (28%) which both contain dense bacterial populations. Only small amounts of MBFA were found in *Spirastrella* ('*Acanthochaetetes*') *wellsii* (1.2%) and in *Phakellia ventilabrum* (0.3%) which both possess only minor quantities of eubacteria. In the Hexactinellida, isomeric MBFA are present in many species, although in smaller amounts than in most demosponges (<5%). MBFA were not observed in the Calcarea studied.

A further remarkable feature of many sponge lipid fractions are acyclic, tail-to-tail linked isoprenoid hydrocarbons with 2,6,10,15,19-pentamethylcosane (PMI, C<sub>25</sub>) skeletons. PMI and several unsaturated derivatives thereof were observed in all hexactinellids and in particular demosponges (Table 3). All hexactinellids containing the C<sub>25</sub> isoprenoids also show the presence

of the structurally related C<sub>40</sub> homologue lycopane (2,6,10,14,19,23,27,31-octamethyldotriacontane) in even higher amounts. Neither PMI, lycopane nor any other irregular isoprenoid has as yet been found in the Calcarea.

## Discussion

The very long carbon chains of hexactinellid LCFA and the unusual  $\Delta^{5,9}$ -unsaturation are patterns identical to those found in the so-called 'demospongiac acids' which are classically considered unique to the Demospongiae. Incorporation studies revealed that demosponges possess a very active fatty acid chain elongation system and synthesize these LCFA by C<sub>2</sub> elongation of short-chain precursors followed by  $\Delta^{5,9}$  desaturation (see Hahn et al.

1988). From our results, a similar mechanism can be proposed to operate in the Hexactinellida. Potential precursors of their most prominent  $C_{30}^{5,9,23}$  and  $C_{30}^{5,9,21}$  fatty acids are the monoenoic, short-chain homologues  $C_{16}^9$ ,  $C_{18}^9$  and/or  $C_{18}^{11}$ . These compounds most probably originate from bacterial lipids (Hahn et al. 1988) and occur in significant amounts in all hexactinellids. The co-occurrence of principal LCFA with unique unsaturation patterns implies very similar or identical enzyme systems for their biosynthesis, and provides a convincing argument for a close phylogenetic association of the Demospongiae and the Hexactinellida.

As for the linear compounds, short-chain MBFA can be considered as plausible precursors of mid-chain methylated sponge LCFA. These compounds frequently occur in demosponges, but among the hexactinellids studied, they were restricted to the Hyalonematidae, a phylogenetically 'diverged' taxon of the subclass Amphidiscophorida (Tabachnik and Menshenina 1999). MBFA are common compounds in many eubacteria and their presence in sponges has thus been attributed to non-phototrophic, associated microorganisms rather than to direct synthesis by the host sponge (Gillan et al. 1988; Thiel et al. 1999). However, the complex isomeric MBFA mixtures typically found in sponges have as yet not been reported from other organisms, nor from marine sediments and sea-water. Anticipating a microbial origin, we regard these MBFA as originating from distinctive eubacteria highly adapted to the internal sponge environment.

PMI derivatives are used as specific archaeal biomarkers (Tornabene et al. 1979; Wakeham 1990; Schouten et al. 1997) and thus point at the presence of associated Archaea in the respective sponges. Unlike PMI, direct sources for lycopane have not been reported. Lycopane-type polyenes occur in several halophiles (Langworthy 1985) and were found in a thermophilic Archaeon (Lattuati et al. 1998). Although these compounds are also present in phototrophic, anaerobic eubacteria (Smith 1988), and were even detected in oxic ocean waters (Wakeham 1990), lycopane was plausibly proposed as a sedimentary biomarker for Archaea, when co-occurring with other diagnostic isoprenoid markers (Brassell et al. 1981). For the hexactinellids studied, the co-occurrence with PMI derivatives suggests lycopane as a further indicator for associated Archaea, namely for the deep-water sponges which certainly lack associated -phototrophs.

The presence of archaeal isoprenoids in Hexactinellida and Demospongiae meets a previous discovery of psychrophilic crenarchaeotes as demosponge symbionts (Preston et al. 1996). From our data, we suggest that the Hexactinellida and the Demospongiae, to the exclusion of the Calcarea, share essentially the same common microbial communities, based on distinctive archaeal and eubacterial taxa. Although these yet unknown organisms occur in both classes, a more pronounced presence of isoprenoid biomarkers suggests a more crucial affinity for specific Archaea in the Hexactinellida (Table 3). Eubacteria, as evidenced by MBFA, show a marked pres-

ence throughout the demosponges, but a more scattered distribution among the Hexactinellida. Hence it appears that the evolution of both sponge classes may have been accompanied (or controlled?) by a shift in the abundance and/or quality of their associated microbiota. In any case, the occurrence of the biomarker patterns observed independently of the geographical and environmental settings supports the idea that these microbiota are a constituent property of the porifera and have been 'inherited' in the protective environment of their hosts throughout geological times (Wilkinson 1984).

## Conclusions

- The membrane fatty acids of the Hexactinellida preserve an ancestral strategy of lipid biosynthesis. It involves the use of bacterial precursor lipids and results in different biomembrane structures and properties than those found in contemporary organisms other than sponges.
- Their unique lipid characteristics put Hexactinellida and Demospongiae into the same phylogenetic group.
- Both classes share a partly similar symbiont distribution, dominated by Archaea in the Hexactinellida and distinctive, sponge-specific eubacteria in the Demospongiae.
- The lipid patterns of the Hexactinellida and the Demospongiae differ from those of the Calcarea, thus a more distant phylogenetic position for the latter.

**Acknowledgements** We thank the crews of the R.V.s 'Seward Johnson', 'Gwendoline May', 'Poseidon', 'Johnson-Sea-Link' and 'Jago' for excellent collaboration during the field-work, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Th 713/1,2; Mi 157/10; SFB 468/BP1, Re 665/14-1 and -12-1 – Leibniz Award), and the Bundesministerium für Bildung und Forschung for financial support. Five anonymous reviewers have greatly improved the quality of the original manuscript. We also thank Friederike Hoffmann for assistance with sponge taxonomy and Susanne Gatti for providing the Antarctic sponge samples. This paper represents publication No. 3 of the research program BOSMAN (03F0256A).

## References

- Adams CL, McInerney JO, Kelly M (1999) Indications of relationships between poriferan classes using full-length 18S rRNA gene sequences. In: Hooper JNA (ed) *Memoirs of the Queensland Museum. Proceedings of the 5th International Sponge Symposium, Brisbane, 1998*, pp 33–44
- Bergquist PR, Lawson MP, Lavis A, Cambie RC (1984) Fatty acid composition and the classification of the Porifera. *Lipids* 12:63–84
- Böger H (1988) Versuch über das phylogenetische System der Porifera. *Meyniana* 40:143–154
- Borchiellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (1998) Phylogenetic analysis of the *Hsp 70* sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol Biol Evol* 15:647–655
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001) *J Evol Biol* 14:171–179
- Brassell SC, Wardroper AMK, Thomson ID, Maxwell JR, Eglinton G (1981) Specific acyclic isoprenoids as biological

- markers of methanogenic bacteria in marine sediments. *Nature* 290:693–696
- Cavalier Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE, Boury-Esnault N, Vacelet J (1996) Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can J Zool* 74:2031–2045
- Collins A (1998) Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: an analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15458–15463
- Garson MJ, Zimmerman MP, Battershill CN, Holden JL, Murphy PT (1994) The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids* 29:509–516
- Gillan FT, Stoilov IL, Thompson JE, Hogg RW, Wilkinson CR, Djerassi C (1988) Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids* 23:1139–1145
- Hahn S, Stoilov IL, Tam Ha TB, Raederstorff D, Doss GA, Li H-T, Djerassi C (1988) Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J Am Chem Soc* 110:8117–8124
- Hooper JNA (2000) Sponguide. Guide to sponge collection and identification, version August 2000. Queensland Museum, Brisbane, Australia, pp. 129 [available online: <http://www.qmuseum.qld.gov.au/organisation/sections/sessilemarineinvertebrates/spong.pdf>]
- Langworthy TA (1985) Lipids of archaeobacteria. In: Woese CR, Wolfe RS (eds) *The bacteria: a treatise on structure and function*. VIII. Archaeobacteria. Academic Press, New York, pp. 459–497
- Lankelma J, Ayanoglu E, Djerassi C (1983) Double-bond localization in long-chain polyunsaturated fatty acids by chemical ionisation-mass spectrometry. *Lipids* 18:853–858
- Lattuati A, Guezennec J, Metzger JP, Largeau C (1998) Lipids of *Thermococcus hydrothermalis*, an Archaea isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Lipids* 33:319–326
- Lawson MP, Bergquist PR, Cambie RC (1984) Fatty acid composition and classification of the Porifera. *Biochem Syst Ecol* 12:375–393
- Litchfield C, Greenberg AJ, Noto G, Morales RW (1976) Unusually high levels of C<sub>24</sub>–C<sub>30</sub> fatty acids in sponges of the class Demospongiae. *Lipids* 11:567–570
- Mackie GO, Singla CL (1983) Studies on Hexactinellida. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe 1873). *Proc R Soc Lond B* 301:365–400
- Medina M, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9707–9712
- Müller WEG (1997) Evolution of Protozoa to Metazoa. *Theor Biosci* 116:145–168
- Preston CM, Wu KY, Molinski TF, DeLong EF (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Crenarchaeum symbiosum* gen. nov. sp. nov. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6241–6246
- Reiswig HM (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). *Colloq Int CNRS* 291:173–180
- Reiswig HM, Mackie GO (1983) Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of Hexactinellida within the Porifera. *Philos Trans R Soc Lond B* 301:419–428
- Reitner J, Mehl D (1996) Monophyly of the Porifera. *Verh Naturwiss Ver Hamburg (NF)* 36:5–32
- Schouten S, Maarel JEC van der, Huber R, Sinninghe Damsté JS (1997) 2,6,10,15,19-Pentamethylcosenes in *Methanobolus bombayensis*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Org Geochem* 26:409–414
- Schütze J, Krasko A, Custodio MR, Efremova SM, Müller IM, Müller WEG (1999) Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proc R Soc Lond B* 266:63–73
- Skorokhod A, Gamulin V, Gundacker D, Kavsan V, Müller IM, Müller WEG (1999) Origin of insulin receptor-like tyrosin kinases in marine sponges. *Biol Bull* 197:198–206
- Smith PF (1988) Archaeobacteria and other specialized bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) *Microbial lipids*. I. Academic Press, London, pp. 489–553
- Soest RWM van, Braekman JC (1999) Sponge systematics: a review. *Mem Queensl Mus* 44:569–589
- Tabachnik KR, Menshenina LL (1999) An approach to the phylogenetic reconstruction of Amphidiscophora (Porifera: Hexactinellida). In: Hooper JNA (ed) *Memoirs of the Queensland Museum. Proceedings of the 5th international sponge symposium*, Brisbane, 1998, pp. 607–615
- Thiel V, Jenisch A, Wörheide G, Löwenberg A, Reitner J, Michaelis W (1999) Branched alkanolic acids from ‘living fossil’ demosponges: a link to ancient sedimentary lipids? *Org Geochem* 30:1–14
- Tornabene TG, Langworthy TA, Holzer G, Oro J (1979) Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic archaeobacteria. *J Mol Evol* 13:73–83
- Van de Peer Y, De Wachter R (1997) Evolutionary relationships among the eucaryotic crown taxa taking into account site-to-site variation in 18S rRNA. *J Mol Evol* 45:619–630
- Wakeham SG (1990) Algal and bacterial hydrocarbons in particulate matter and interfacial sediment of the Cariaco Trench. *Geochim Cosmochim Acta* 54:1325–1336
- Wilkinson CR (1984) Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. *Proc R Soc Lond B* 220:509–51
- Zrzavý J, Mihulka S, Kepka P, Bezdek A, Tietz D (1998) Phylogeny of the metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* 14:249–285

**Note added in proof** Poriferan paraphyly, with elevation of class Calcarea to phylum level (“Calcispongia”), was proposed by Zrzavý et al. (1998) and most recently by Borchiellini et al. (2001). However, a new detailed study using an extended genetic data set (full length 18S and 28S rDNA sequences) could not resolve this issue with sufficient statistical significance (Medina et al., 2001). Hence the proposal of sponge paraphyly is still contentious. Our independent biomarker approach now clearly supports a close genealogical relationship of Demospongiae and Hexactinellida, with a more distant phylogenetic position of Calcarea. However, our data do not necessarily support either poriferan mono- or paraphyly (due to a lack of outgroup comparison, which is currently in progress).

Volker Thiel · Martin Blumenberg · Jens Hefter  
Thomas Pape · Shirley Pomponi · John Reed  
Joachim Reitner · Gert Wörheide · Walter Michaelis

## A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges

Published online: 26 March 2002  
© Springer-Verlag 2002

---

### Naturwissenschaften (2002) 89:60–66

Due to an unfortunate error during the typesetting process, three entries which should have been in column 7 ( $C_{16}\Delta^9$ ) were put in column 6 (LCFA  $\Delta^{5,9}$  brominated) of Table 3. The correct table is printed below.

---

The online version of the original article can be found at  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00114-001-0284-9>

---

V. Thiel (✉) · M. Blumenberg · T. Pape · W. Michaelis  
Institut für Biogeochemie und Meereschemie,  
Universität Hamburg, Bundesstrasse 55,  
20146 Hamburg, Germany  
e-mail: [thiel@geowiss.uni-hamburg.de](mailto:thiel@geowiss.uni-hamburg.de)  
Fax: +49-40-428386347

J. Hefter  
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,  
Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven, Germany

S. Pomponi · J. Reed  
Division of Biomedical Marine Research,  
Harbor Branch Oceanographic Institution,  
5600 US 1 North, Fort Pierce, FL 34946, USA

J. Reitner  
Göttinger Zentrum Geowissenschaften, Universität Göttingen,  
Goldschmidtstrasse 3, 37077 Göttingen, Germany

G. Wörheide  
Queensland Centre for Biodiversity, Queensland Museum, P.O.  
Box 3300, South Brisbane, Qld 4101, Australia

**Table 3** Lipid properties of chemotaxonomic importance. *Filled circles* Significant relative amounts; *open circles* minor relative amounts; *Tr.* trace amounts; *no entry* compound or compound class absent; *n.a.* not analysed. *LCFA* Long-chain fatty acids; *MBFA* mid-chain branched fatty acids;  $\Delta^{x,y}$  double bond position(s); *PMI* 2,6,10,15,19-pentamethylcosane;  $C_{16}^9$  *cis*-hexadec-9-enoic acid

		LCFA $\Delta^{5,9}$	LCFA $\Delta^{5,9}$ mid-chain branched	MBFA	LCFA $\Delta^{5,9}$ brominated	$C_{16}^9$	PMI, PMIA	Lycopane
<b>Hexactinellida</b>								
<i>Staurocalyptus sp.</i>	Hexasterophora	●		○		●	Tr.	●
<i>Acanthascus sp.</i>		●		○		●	Tr.	●
Unknown sp. 1		●		○		○	●	●
<i>Rossella sp. 1</i>		●	n.a.	n.a.		●	○	
<i>Rossella sp. 2</i>		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
<i>Rossella sp. 3</i>		●	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.
<i>Aulosaccus cf. mitsuk.</i>		●		Tr.		○	●	●
Unknown sp. 2		●		○		●	Tr.	●
<i>Sympagella nux</i>		●		○		○	○	●
<i>Sympagella nov. sp.</i>		●		●		●	Tr.	●
<i>Euplectella sp.</i>		●		Tr.		●	●	●
Unknown sp. 3		●		○		○	●	●
Unknown sp. 4		●				Tr.	●	●
Unknown sp. 5		●		●		○	●	●
Unknown sp. 6		●		○		○	○	●
<i>Farrea (?) sp.</i>		●				○	●	●
<i>Ipheton panicea</i>		●		○		○	●	●
Heterochone sp.		●		○		●	●	●
Unknown sp. 7		●		○		●	●	●
<i>Hyalonema (?) sp. 1</i>	Amphidiscophora	●	●	●		●	○	●
<i>Hyalonema sp. 2</i>		●	●	○		○	●	●
Unknown sp. 8		●	●	○		●	n.a.	n.a.
Unknown sp. 9		●		○		○	○	●
<b>Demospongiae</b>								
<i>Geodia barretti</i>	Tetractinomorpha	●	●	●		●		
<i>Spirastrella wellsi</i>		●		Tr.		n.a.		
<i>Haliclona sp.</i>	Ceractinomorpha	●	●	●		●		
<i>Petrosia crassa</i>		●	●	●	●	●	Tr.	
<i>Astrosclera willeyana</i>		●		●		n.a.		
<i>Agelas oroides</i>		●		●	○	n.a.		
<i>Phakellia ventilabrum</i>		●		Tr.	●	●		
<i>Axinella infundibulif</i>		●		○	●	●	Tr.	●
<b>Calcarea</b>								
<i>Grantiopsis (cylindr.?)</i>	Calcaronea					○		
<i>Sycon gelatinosum</i>						○		
<i>Leucaltis (clathria?)</i>	Calcinea					○		
<i>Leucetta sp.</i>						○		
<i>Pericharax heteroraph.</i>						Tr.		
<i>Levinella prolifera</i>						●		

## BIPHYTANES AS BIOMARKERS FOR SPONGE ASSOCIATED ARCHAEA

PAPE T.\*, BLUMENBERG M.\*, THIEL V.\*\* & MICHAELIS W.\*

\*Institut für Biogeochemie und Meereschemie, Universität Hamburg

\*\*Geowissenschaftliches Zentrum, Abteilung Geobiologie, Universität Göttingen

E-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de

### ABSTRACT

Various sponges of the classes Hexactinellida and Demospongiae were studied for the presence of archaeal biomarkers. In several species four ether-bound isoprenoids of the biphytane series (C<sub>40</sub>), which are known as abundant lipid constituents of Archaea, were found. The lack of these biomarkers in some sponges implies, that a prominent influence of dietary plankton has to be excluded, and gives evidence that associations of Archaea and specific sponge taxa are more common than previously thought. Highest concentrations of biphytanes were found in the hexactinellid *Aulosaccus* cf. *mitsukuri* and the demosponge *Phakellia ventilabrum*. The structural characteristics of the biphytanes indicate that these compounds are predominantly of crenarchaeotal origin.

### KEYWORDS

biphytanes, Crenarchaeota, Hexactinellida, Demospongiae, biomarker

### INTRODUCTION

Sponges (phylum Porifera) are the most primitive metazoans whose origins date back to Precambrian times. Numerous taxa are known to maintain diverse prokaryotic communities (WEBSTER *et al.*, 2001; HENTSCHEL *et al.*, 2002; and refs. cited in either). These prokaryote-eukaryote relationships may have formed an integral part in the metazoan evolution (WILKINSON, 1984; BRUNTON & DIXON, 1994).

In general, sponge associated microorganisms (SAM) are considered to be involved in essential ecological processes, like nutrient acquisition (VACELET *et al.*, 1995), the supply of precursor lipids incorporated into sponge cell membranes (HAHN *et al.*, 1988), or the production of secondary metabolites (for refs. see e.g. WEBSTER & HILL, 2001). In particular, for the Demospongiae numerous studies have shown, that their associated microbiota comprise a variety of phylogenetic groups of the domain Bacteria (WEBSTER *et al.*, 2001; HENTSCHEL *et al.*, 2002; among others). Nevertheless, employing diverse techniques it has been shown, that most sponge specific Bacteria elude traditional cultivation methods. Therefore, the ecological functions of most sponge associated Bacteria are still unclear.

Although frequently attempted by applying different methodological approaches, indications for sponge associated Archaea have been reported rarely (PRESTON *et al.*, 1996; FUERST *et al.*, 1999; MARGOT *et al.*, 2002). Up to now, only members of the Crenarchaeota subgroup have unambiguously been identified in halichondrid demosponges. As indicated by phylogenetic surveys, sponge specific Archaea are close affiliates of pelagic crenarchaeotes. However, representatives of non-thermophilic Crenarchaeota resisted isolation in pure culture so far; thus, their general metabolic capabilities remain unknown.

In a recent comprehensive lipid study of numerous sponges from different geographical settings we frequently identified isoprenoid hydrocarbons diagnostic for Archaea (THIEL *et al.*, 2002). These findings prompted us to focus on the presence of biomarkers highly specific for archaeal subgroups in selected sponges. Further on, the biphytane biomarker concentrations were applied for an estimation of archaeal cells in the sponge tissues.

### MATERIALS AND METHODS

The sponges analysed for lipid biomarkers are listed in Tab. I. The specimens were sampled by manned submersibles or by triangular dredge and kept at -20°C immediately upon collection. The tissues examined were drawn from the internal parts of the mesohyl and lyophilized prior to analysis.

The samples (2 to 4 g dry weight) were extracted and lipids separated as previously described (MICHAELIS *et al.*, 2002). Briefly, neutral lipids were extracted and saponified by refluxing in a mixture of KOH in CH<sub>3</sub>OH, followed by liquid/liquid extraction with *n*-hexane. Fatty acids were obtained by extraction of the acidified residual phase and subsequently methylated. Double bond positions of fatty acid methyl esters were determined by derivatization to their *n*-acylpyrrolidides. From the neutral lipid fraction polar lipids were separated by thin layer chromatography.

The polar lipid fraction, comprising glycerol dibiphytanyl glycerol tetraethers (GDGTs), was subjected to cleavage of ether bonds (HI) and subsequent reduction (LiAlH<sub>4</sub>) of the alkyl iodides to hydrocarbons.

Fatty acid methyl esters and hydrocarbons were analysed by capillary gas chromatography (GC) and combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as described elsewhere (MICHAELIS *et al.*, 2002).

Identifications of organic compounds were based on their relative GC retention times, on coinjection with authentic standards prepared from the hyperthermophilic crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus* (DE ROSA *et al.*, 1986), and on comparison of their mass spectra with those of published data (SCHOUTEN *et al.*, 1998). Concentrations were determined by GC using 5 $\alpha$ (H)-cholestane as an internal standard.

## RESULTS

The polar lipids of nine species of the Hexactinellida and the Demospongiae were analysed for the occurrence of archaeal biomarkers. Four archaeal C<sub>40</sub> isoprenoids (biphytanes), deriving from GDGTs, were found in seven species (Tab. I) of six orders after ether bond cleavage. Highest amounts of biphytanes in total were observed in the hexactinellid *A. cf. mitsukuri* (2.4 µg g<sup>-1</sup> dry wt.) and the demosponge *P. ventilabrum* (0.8 µg g<sup>-1</sup> dry wt.).

Tab. I. Taxonomy, sampling locations of sponges, and occurrence of biphytanes

<i>Species</i>	<i>Order</i>	<i>Sampling location</i>	<i>Water depth [m]</i>	<i>Abundance [Σ C<sub>40</sub>]</i>
<b>Hexactinellida</b>				
<i>Aulosaccus cf. mitsukuri</i> (IJIMA, 1898)	<i>Lyssakinosida</i>	Isla Bartholome, Galapagos	440	<b>high</b>
<i>Iphiteon panicea</i> (BOWERBANK, 1869)	<i>Hexactinosida</i>	Turks & Caicos, Caribbean	480	<b>high</b>
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1 (GRAY, 1832)	<i>Amphidiscosida</i>	Negril, Jamaica	375	<b>tr.</b>
<i>Hyalonema</i> sp. 2 (GRAY, 1832)	<i>Amphidiscosida</i>	Long Island, Bahamas	800	<b>n.d.</b>
<b>Demospongiae</b>				
<i>Geodia barretti</i> (BOWERBANK, 1858)	<i>Astrophorida</i>	Sula-Ridge, Norway	320	<b>n.d.</b>
<i>Pachymatisma johnstonia</i> (BOWERBANK, 1842)	<i>Astrophorida</i>	Korsfjord, Norway	100-200	<b>tr.</b>
<i>Mycale lingua</i> (BOWERBANK, 1866)	<i>Poecilosclerida</i>	Sula-Ridge, Norway	290	<b>low</b>
<i>Phakellia ventilabrum</i> (LINNEAUS, 1767)	<i>Halichondrida</i>	Sula-Ridge, Norway	290	<b>high</b>
<i>Phakellia robusta</i> (BOWERBANK, 1866)	<i>Halichondrida</i>	Korsfjord, Norway	100-200	<b>moderate</b>

tr. = trace, n.d. = not detected

The biphytanes in sponges possessed no to three cycloalkyl rings (C<sub>40</sub> 0, C<sub>40</sub> I, C<sub>40</sub> II and C<sub>40</sub> III; Fig. 1, Fig. 2). Our experiments indicated that the acyclic C<sub>40</sub> 0 and the cyclopentyl ring-containing C<sub>40</sub> I and C<sub>40</sub> II in sponges are structurally identical to those identified in *S. solfataricus*. In contrast, the retention time and mass spectral characteristics of the C<sub>40</sub> III compounds in sponges are different to those found in *S. solfataricus*, suggesting that they are structural isomers (HOEFS *et al.*, 1997; DELONG *et al.*, 1998; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002b).

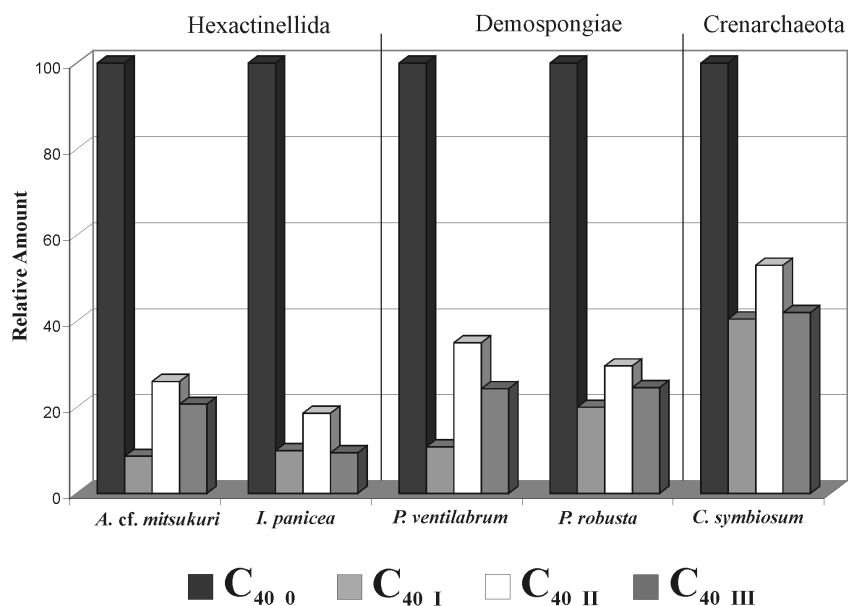


Fig. 1. Abundance of C<sub>40</sub> 0, C<sub>40</sub> I, C<sub>40</sub> II and C<sub>40</sub> III (normalized to C<sub>40</sub> 0) in selected sponges. Abundance in the crenarchaeotal sponge symbiont *C. symbiosum* is shown for comparison (data adapted from DELONG *et al.*, 1998)

Considering the diverse settings, the distributions of biphytanes varied slightly in each sponge, with the acyclic  $C_{40\ 0}$  always being the main component followed by the  $C_{40\ II}$  homologue (18.6 to 35.0 % relative to the abundance of  $C_{40\ 0}$ ). With one exception (*I. panicea*) the lowest relative abundances were observed for the  $C_{40\ I}$  (7.7 to 20 %). Therefore, the  $C_{40}$  isoprenoid distributions were fairly similar in sponges of different origins and water depth.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

We discovered for the first time ether-derived acyclic ( $C_{40\ 0}$ ) and internally cyclized ( $C_{40\ I}$  to  $III$ ) biphytanes indicative for Archaea in various sponge orders (Tab. I). These compounds were absent in the sponges *Hyalonema* sp. 2 and *Geodia barretti*, suggesting that the biphytanes originated from sponge-specific Archaea. With regard to our observations, it is remarkable that, so far, archaeal symbionts have been discovered only in halichondrid sponges (PRESTON *et al.*, 1996; MARGOT *et al.*, 2002).

The biosynthesis of biphytanes with two and three cycloalkyl rings accompanied by the acyclic homologue seems to be diagnostic for the *Crenarchaeota* subgroup (PEARSON *et al.*, 2001). Indeed, the distribution patterns of biphytanes in the sponges are very similar to those observed in enrichments of the crenarchaeotal sponge symbiont *Cenarcheum symbiosum* (Fig. 1). However, in comparison to *C. symbiosum*, a higher relative abundance of the  $C_{40\ 0}$  was found in the sponges studied, suggesting an additional contribution by euryarchaeotes (TORNABENE & LANGWORTHY, 1978; KOGA *et al.*, 1993).

Very recently SINNINGHE DAMSTÉ *et al.* (2002b) determined by two-dimensional high resolution NMR studies the structure of a GDGT termed crenarchaeol, which is thought to be indicative of nonthermophilic crenarchaeotes. Crenarchaeol comprises a  $C_{40\ II}$  and a  $C_{40\ III}$ , the latter possessing two cyclopentyl and one cyclohexyl ring (Fig. 2). The mass spectra of the  $C_{40\ III}$  in sponges are similar to those published previously for crenarchaeol derived  $C_{40\ III}$  (SCHOUTEN *et al.*, 1998), suggesting that  $C_{40\ III}$  in our samples emanated from crenarchaeol.

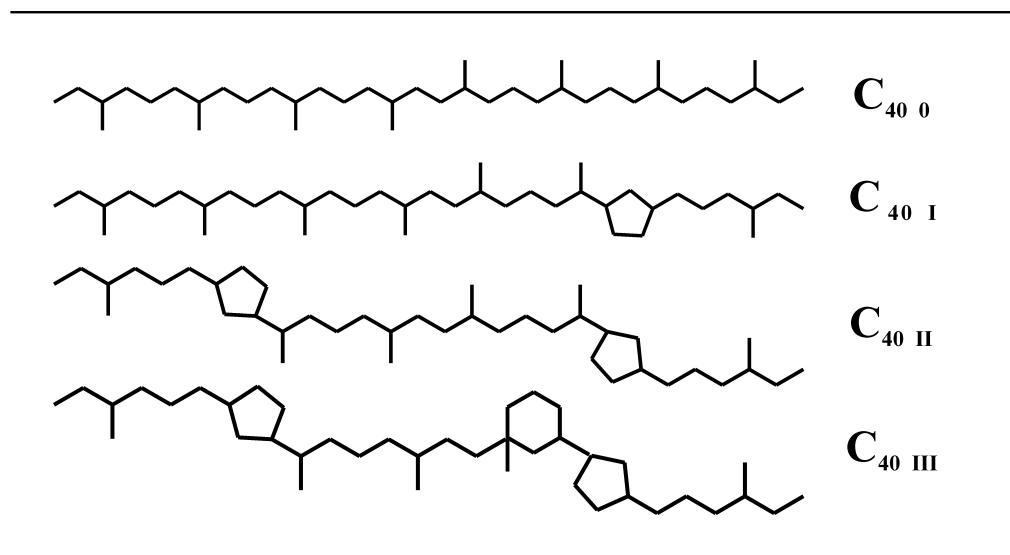


Fig. 2. Structures of GDGT derived biphytanes found in sponges. Shown are the acyclic  $C_{40\ 0}$  and the internally cyclized  $C_{40\ I}$ ,  $C_{40\ II}$  and  $C_{40\ III}$ .

Based on the total amounts of biphytanes, the minimum portion of archaeal biomass in sponges can be roughly estimated as follows: it is assumed, that one cell of marine Archaea contains  $1.0 \times 10^{-15}$  g GDGTs (SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 2002a). Considering the quantitative distributions of biphytanes in the sponges examined, one archaeal cell would contain, on average,  $0.9 \times 10^{-15}$  g biphytanes bound in GDGT. For *P. ventilabrum*  $0.8 \times 10^{-6}$  g biphytanes per gram sponge tissue (dry wt.) were measured, which corresponds to about  $0.9 \times 10^9$  archaeal cells  $g^{-1}$ . Given the cell weight observed for methanogenic Archaea (one cell corresponds to  $1.7 \times 10^{-13}$  g (dry wt.); WHITE *et al.*, 1979), the portion of archaeal biomass in *P. ventilabrum* may be estimated to be  $0.2 \text{ mg } g^{-1}$  (dry wt.) sponge tissue.

In comparison, using DAPI staining and microscopic counting, bacterial cells in homogenates of *P. ventilabrum* were calculated to be  $2.4 \times 10^{11} g^{-1}$  (dry wt.) (*pers. comm.* I. Graeber). Assuming that cells of sponge-associated Bacteria on average are similar in size and weight to those of the bacterium *Escherichia coli* (one dried cell is equivalent to  $1.7 \times 10^{-13}$  g; MANCUSO *et al.*, 1990), *P. ventilabrum* would contain about 40.8 mg bacterial biomass  $g^{-1}$  (dry wt.). Thus, it may be concluded that Archaea – though most probably associated to various sponge taxa – in *P. ventilabrum* constitute a comparatively small fraction of sponge-associated microorganisms.



Biomarker analysis in a number of studies have proven to be an effective and specific tool to document the composition and metabolic capabilities of microorganisms in fossil and recent sample sets. Employing this methodological approach to examine the microbial communities in sponges, our work established for the first time that:

- Archaea, as evidenced by the presence of biphytanes, are more common constituents of sponge-associated microorganisms than previously thought;
- the distribution of biphytanes in sponges reveals a specific crenarchaeal population in sponges rather than a contribution of pelagic crenarchaeotes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the captain and crew of R.V. 'POSEIDON' as well as K. Hissmann and J. Schauer of the 'JAGO' submersible team for excellent collaboration during field work. We are indebted to S.A. Pomponi and J. Reed (Harbor Branch Oceanographic Institution) for providing sponge samples and taxonomical classification, respectively. G. Antranikian (Technical University Hamburg–Harburg) kindly donated cells of *Sulfolobus solfataricus*.

The valuable assistance in sponge taxonomical work by F. Hoffmann, J. Reitner and H. T. Rapp is very much appreciated. F. Boenkendorf, K. Peterknecht, S. Beckmann, I. Graeber and I. Kaesler are also thanked for analytical work.

Thanks are also due to the crews of R.V. 'HANS BRATTSTRÖM' and the Marine Biological Station of Bergen University, Norway. Access to these facilities has been supported by the IHP program from the European Union through contract no. HPRI-CT-1999-00056.

This is publication no. 27 of the research program BOSMAN (03F0256A-D). Financial support was provided by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany.

## REFERENCES

- BRUNTON F. R., DIXON O. A., 1994 - Siliceous sponge-microbe biotic associations and their recurrence through the Phanerozoic as reef mound constructors. *Palaios* **9**: 370-387.
- DE ROSA M., GAMBACORTA A., GLIOZZI A., 1986 - Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol. Rev.* **50** (1): 70-80.
- DE LONG E. F., KING L. L., MASSANA R., CITTONI H., MURRAY A., SCHLEPER C., WAKEHAM S. G., 1998 - Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic Crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (3): 1133-1138.
- FUERST J. A., WEBB R. I., GARSON M. J., HARDY L., REISWIG H. M., 1999 - Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.* **44**: 193-203.
- HAHN S., STOILOV I. L., TAM HA T. B., RAEDERSTORFF D., DOSS G. A., LI H.-T., DJERASSI C., 1988 - Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **110** (24): 8117-8124.
- HENTSCHEL U., HOPKE J., HORN M., FRIEDRICH A. B., WAGNER M., HACKER J., MOORE B. S., 2002 - Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (9): 4431-4440.
- HOEFS M. J. L., SCHOUTEN S., DE LEEUW J. W., KING L. L., WAKEHAM S. G., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., 1997 - Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (8): 3090-3095.
- KOGA Y., NISHIHARA M., MORII H., AKAGAWA-MATSUSHITA M., 1993 - Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiol. Rev.* **57** (1): 164-182.
- MANCUSO C. A., FRANZMANN P. D., BURTON H. R., NICHOLS P. D., 1990 - Microbial community structure and biomass estimates of a methanogenic Antarctic Lake ecosystem as determined by phospholipid analyses. *Microb. Ecol.* **19**: 73-95.
- MARGOT H., ACEBAL C., TORIL E., AMILS R., FERNANDEZ PUENTES J. L., 2002 - Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.* **140**: 739-745.
- MICHAELIS W., SEIFERT R., NAUHAUS K., TREUDE T., THIEL V., BLUMENBERG M., KNITTEL K., GIESEKE A., PETERKNECHT K., PAPE T., BOETIUS A., AMANN R., JØRGENSEN B.-B., WIDDEL F., PECKMANN J., PIMENOV N. V., GULIN M. B., 2002 - Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297** (5583): 1013-1015; *supporting online material*: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/297/5583/1013/DC1>
- PEARSON A., McNICHOL A. P., BENITEZ-NELSON B. C., HAYES J. M., EGLINTON G., 2001 - Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediments: A case study using compound-specific  $\Delta^{14}\text{C}$  analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (18): 3123-3137.
- PRESTON C. M., WU K. Y., MOLINSKI T. F., DE LONG E. F., 1996 - A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6241-6246.
- SCHOUTEN S., HOEFS M. J. L., KOOPMANS M. P., BOSCH H.-J., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., 1998 - Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Org. Geochem.* **29** (5-7): 1305-1319.
- SINNINGHE DAMSTÉ J. S., RIJPSMA W. I. C., HOPMANS E. C., PRAHL F. G., WAKEHAM S. G., SCHOUTEN S., 2002a - Distribution of membrane lipids of planktonic *Crenarchaeota* in the Arabian Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (6): 2997 - 3002.

- SINNINGHE DAMSTÉ J. S., SCHOUTEN S., HOPMANS E. C., VAN DUIN A. C. T., GEENEVASEN J. A. J., 2002b - Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J. Lipid Res.* **43**: 1641-1654.
- THIEL V., BLUMENBERG M., HEFTER J., PAPE T., POMPONI S. A., REED J., REITNER J., WÖRHEIDE G., MICHAELIS W., 2002 - A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**: 60-66.
- TORNABENE T. G., LANGWORTHY T. A., 1978 - Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science* **203**: 51-53.
- VACELET J., BOURY-ESNAULT N., FIALA-MEDIONI A., FISHER C. R., 1995 - A methanotrophic carnivorous sponge. *Nature* **377**: 296.
- WEBSTER N. S., HILL R. T., 2001 - The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an  $\alpha$ -Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**: 843-851.
- WEBSTER N. S., WILSON K. J., BLACKALL L. L., HILL R. T., 2001 - Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (1): 434-444.
- WHITE D. C., DAVIS W. M., NICKELS J. S., KING J. D., BOBBIE R. J., 1979 - Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**: 51-62.
- WILKINSON C. R., 1984 - Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbiosis in marine sponges. *Proc. R. Soc. Lond. B* **220**: 509-517.

Martin Blumenberg · Volker Thiel · Thomas Pape  
Walter Michaelis

## The steroids of hexactinellid sponges

Received: 1 March 2002 / Accepted: 9 June 2002 / Published online: 23 July 2002  
© Springer-Verlag 2002

**Abstract** The Hexactinellida ('glass sponges') are commonly considered to be the most basic metazoans. Steroids of 20 species from different taxa were studied for chemotaxonomy and biosynthetic implications. All Hexactinellida contain cholest-5-en-3 $\beta$ -ol (cholesterol) and/or its saturated derivative 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol, along with their C-24-alkylated homologues. Where 5 $\alpha$ (H)-stanols are present, they regularly co-occur with their 3-keto analogues. The steroid concentrations generally decrease with increasing carbon numbers, similar to sterol distributions typically found in marine sediments. These features argue against de novo sterol biosynthesis operating in hexactinellid sponges. Rather, we suggest a dietary uptake of  $\Delta^5$ -stenols and their stereoselective transformation via 3-keto intermediates to 5 $\alpha$ (H)-stanols.

### Introduction

In addition to fatty acids, sterols are basic lipid constituents in eukaryotic cells. Sponges (Porifera), in particular, are known to be a rich source of unique sterols with complex nuclei and side-chain modifications (Djerassi and Silva 1991; Kerr and Baker 1991; Giner 1993; Aiello et al. 1999). The biosynthetic origin of sponge sterols is ambivalent and a subject of ongoing research. Sterols from members of the class Demospongia appear to originate from one or more of the four processes: (1) de novo biosynthesis, (2) dietary uptake, (3) dietary uptake and modification and (4) interaction with associated microorganisms (Goat 1981; Djerassi and Lam 1991).

The study of sponge sterols is not only interesting from a biochemical viewpoint but has also provided relevant information on the taxonomic classification of these

organisms (Bergquist et al. 1991). Although the overall applicability of sterol composition for sponge classification has been questioned (Fromont et al. 1994; van Soest and Braekman 1999), particular compounds may characterize specific taxa such as in the demosponge orders Petrosida (Sica and Zollo 1978; Gauvin et al. 1998) and Axinellida (De Rosa et al. 1973; Minale and Sodano 1974). Previous sterol studies have largely focused on demosponges, due to their diversity and their abundance in shallow-water environments. In contrast, there have only been a few studies on a limited number of species and chemical properties on the classes Calcarea (calcareous sponges) (Bergquist et al. 1986) and, in particular, the Hexactinellida (Guella et al. 1988).

The Hexactinellida are considered to be an early branch within the Porifera. They show 'hexactine' siliceous spicules and a unique mode of soft body organization. Much of their tissue consists of multinucleate cytoplasm ('choanosyncytium') comprising collared bodies, sharing a common nucleus and linked together by plasmic bridges (Reiswig 1979; Mackie and Singla 1983). The oldest remains of hexactinellids have been found in Ediacarian beds (Vendian, Late Precambrian) (Gehling and Rigby 1996; Brasier et al. 1997). Today they inhabit exclusively marine habitats, particularly remote, deeper shelf and slope environments, typically from 200 to 2,000 m water depth.

Recently, it has been shown that the Hexactinellida contain very long chain  $\Delta^{5,9}$  unsaturated membrane fatty acids, previously considered to be specific biochemicals of demosponges (Thiel et al. 2002). The co-occurrence of these unique 'demospongiac acids' strongly suggests a close phylogenetic relationship between the Hexactinellida and Demospongiae. Corresponding to recent molecular biological work (e.g. Adams et al. 1999 and references therein) these findings conflict with the traditional view of taxonomists, who assigned separate subphylum or phylum status to the Hexactinellida (Reiswig and Mackie 1983; Bergquist 1985).

Only scattered reports exist on steroids of the Hexactinellida (Guella et al. 1988; Kerr et al. 1990). Nothing is

M. Blumenberg · V. Thiel · T. Pape · W. Michaelis (✉)  
Institut für Biogeochemie und Meereschemie,  
Universität Hamburg, Bundesstrasse 55,  
20146 Hamburg, Germany  
e-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de  
Tel.: +49-40-428385001, Fax: +49-40-428386347

**Table 1** Sterols and steroid ketones in the Hexacniniellida (% of total steroids). For locations see Thiel et al. (2002), A=5 $\alpha$ (H)- $\Delta^0$ -3 $\beta$ -ol, B=5 $\alpha$ (H)- $\Delta^0$ -3-one, C= $\Delta^5,22$ -3 $\beta$ -ol, D= $\Delta^5$ -3 $\beta$ -ol, E= $\Delta^4$ -3-one, F= $\Delta^5,24(28)$ -3 $\beta$ -ol. For detailed structures see Fig. 1.  $\Delta^x,y$  = double bond position(s);  $\Delta^0$  denotes a saturated carbon skeleton; + = trace amounts; † = include as yet uncharacterized C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol derivatives, for which an additional C-6 hydroxy group is tentatively assigned based on their mass spectra (main compounds in *Staurocalyptus* sp. and *Acanthascus* sp.); †† = contains C-4 monomethylated sterols (trace amount in *Acanthascus* sp., *Farrea* (?), Unknown sp. 7). Unknown sp. 5 contains two C-4 monomethylated sterols (23% of the total steroids) tentatively assigned by their mass spectra as 4 $\alpha,24$ -dimethyl-5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol and 4 $\alpha$ -methyl-24-ethyl-5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol. Sterols were obtained by repeated extraction

of freeze-dried sponge (~1 g) with 10 ml portions of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:methanol (1:1; v/v). The extract was fractionated using a silica gel column (5 $\times$ 1.5 cm; Merck silica gel 60) into (1) hydrocarbons (two column volumes of *n*-hexane) and (2) sterols/ketones (five column volumes of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:ethyl acetate, 3:1, v/v). For GC, trimethylsilyl (TMS-) ether derivatives of sterols were analysed using a Carlo Erba GC 6000 (column: 30 m DB5, 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness; detector: FID; carrier gas: H<sub>2</sub>; injection: 'on column'; temperature programme: 3 min at 80°C; 80°C to 310°C at 4°C min<sup>-1</sup>; 20 min at 310°C). For compound identification, GC-MS was performed using a Micromass Quattro II spectrometer interfaced to a HP6890 GC (column and temperature programme as above; carrier gas: He)

	C <sub>26</sub>		C <sub>27</sub>		C <sub>28</sub>					C <sub>29</sub>				Others				
	(24-nor)				(24-methyl)					(24-ethyl)								
	A	B	A	B	A	B	C	D	E	A	B	C	D	A	B	C	D	
<b>Hexasterophora</b>																		
<i>Staurocalyptus</i> sp.					+													
<i>Acanthascus</i> sp.					+													
Unknown sp. 1	1	1	25	24	36	3	2	16	2	26				19				
<i>Autosaccus</i> cf. <i>mitsuk.</i>	1	1	25	24	36	3	2	16	2	26				19				
Unknown sp. 2	+		39	17	39	17	+	10	12	17	7	4		5	4			
<i>Sympagella nux</i>	2	2	41	30	41	30	4	4		9	7			3	3			
<i>Sympagella</i> nov. sp.	1		64	+	64	+	1	3		21	+		3	6				
<i>Euplectella</i> sp.			40	7	40	7		2		15	3		1	26	5			
Unknown sp. 3	1		61		61			15		20			2	2				
Unknown sp. 4			8	26	8	26		1		4	8		1	12			40 <sup>††</sup>	
Unknown sp. 5	1		28	27	28	27	2	3		9	12		2	8	9			
Unknown sp. 6			8		8			10		20	+		17	7	2	9	18	
<i>Farrea</i> (?) sp.	+		49	+	49	+	4	42	5	20	+		9	18	2	5	14	
<i>Ipheton panicea</i>			4	24	4	24	3	36			1	2	11		2	10	7 <sup>††</sup>	
<i>Heterochone</i> sp.																		
Unknown sp. 7																		
<b>Amphidiscophora</b>																		
<i>Hyalonema</i> (?) sp. 1			5	2	5	2		69	5	2			2	1			4	10
<i>Hyalonema</i> sp. 2			6		6		+	57		4			15	4			15	
Unknown sp. 8	+		27	4	27	4		26		6	6		13	6	1		8	3
Unknown sp. 9			39	11	39	11		6		19	2		2	2	2		2	16

known about their biosynthesis, although the capacity for sterol side-chain dealkylation has been shown for cell-free extracts from an unknown species (Kerr et al. 1990). The lipid chemistry of the Hexactinellida is nonetheless of particular interest, as no other animal taxon showing such a prolonged, continuous record since the Precambrian is known. Thus, the Hexactinellida may reasonably be regarded as the most ancestral living metazoans. Accordingly, lipid constituents of these 'ultra-conservative' animals could provide an insight into the biosynthetic strategies prevailing at the very early dawn of metazoan evolution. In continuation of our previous work on the fatty acids of the Hexactinellida (Thiel et al. 2002), we here present comprehensive information on steroids in 20 species from representative sub-taxa and different environments worldwide.

## Methods

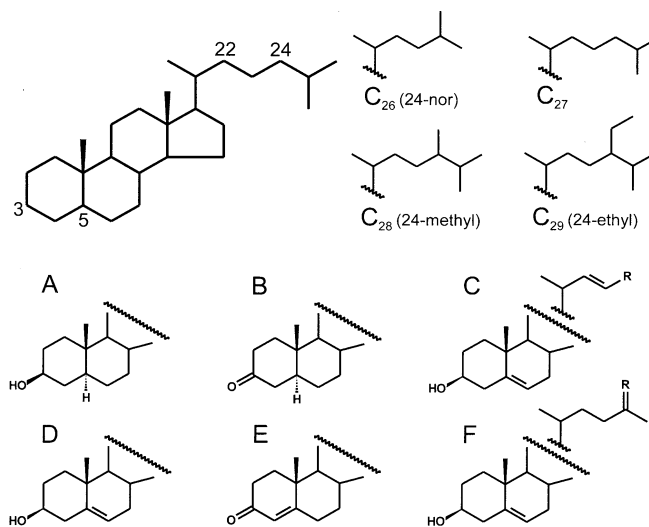
Twenty species of hexactinellid sponges were collected using manned submersibles (Table 1). The sponges were kept below  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Sterols were obtained by extraction with organic solvents and analysed using gas chromatography (GC) and coupled gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). For a preparation outline and analytical methods see caption of Table 1. The structural determination and configurational assignments of hydrogen at C-5 of the steroid nucleus ( $\alpha$  or  $\beta$ ) were achieved by comparison with an authentic standard (5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol). Artefact formation during analytical workup, e.g. through oxidation of sterols to steroid ketones, was checked and ruled out by subjecting reference sterols (cholesterol, 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol) to the same workup procedure as for the sponge samples.

## Results

All the Hexactinellida studied contained steroids in significant concentrations (main compound: 0.29–4.32 mg g<sup>-1</sup> dry sponge). Regardless of subtaxa affiliation, all species showed compound mixtures depicting the conventional cholestane C<sub>27</sub> skeleton with the unsubstituted or C-24 alkylated (methyl- or ethyl-) side chain, and an oxygen-bearing functional group at C-3 (Table 1, Fig. 1). In general, the concentrations of these compounds decrease with increasing carbon numbers. Moreover, nine species contain trace amounts of compounds with a tentatively assigned 24-norcholesterol side chain, and four species showed C-4 monomethylated sterols in minor abundances. Unconventional modifications of the ring or side-chain carbon skeletons, as found in many demosponges, appear to be absent from the hexactinellids.

Most, though not all, Hexactinellida contain C<sub>27</sub>–C<sub>29</sub>  $\Delta^5$ -sterols, with cholesterol generally predominating. Known intermediates occurring during de novo sterol synthesis from squalene, like the 'primitive' C-4 dimethylated sterols, were not observed. Instead, 5 $\alpha$ (H)-stanols are present in most hexactinellids and comprise the most prominent sterols in several species (Table 1, Fig. 1).

As a further remarkable feature, 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3-one and its C-24 alkylated derivatives frequently occur



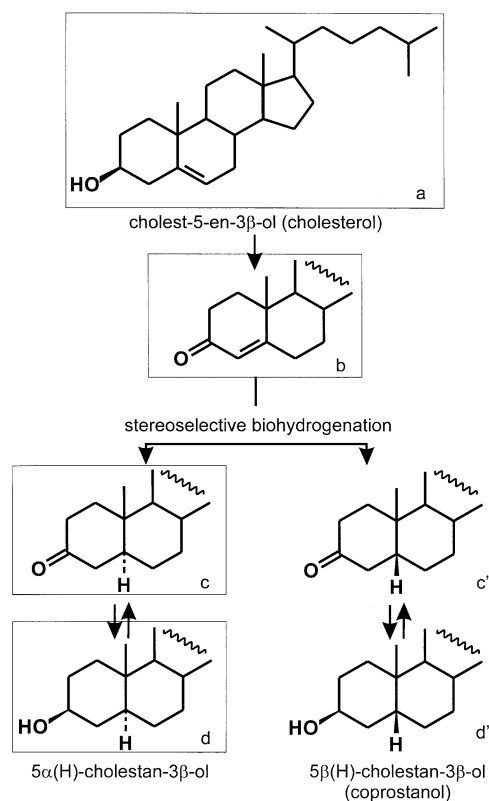
**Fig. 1** Structures of the major steroids and steroid ketones. C: R = alkyl; F: R = CH<sub>2</sub>

in concentrations of the same order of magnitude as those of their stanol counterparts (Table 1). In four samples, low amounts of cholest-4-en-3-one were also found (*Acanthascus* sp., Unknown sp. 2, *Heterochone* sp., *Hyalonema* (?) sp. 1).

## Discussion

The capability for de novo sterol biosynthesis has not yet been examined for the Hexactinellida. The prominence of 5 $\alpha$ (H)-stanols as well as their  $\Delta^5$  counterparts may indicate that these sponges (or their microbial associates) are able to reduce the 5,6 double bond to yield the ring-saturated compounds. Biological sources for 5 $\alpha$ (H)-stanols are scarce but, in comparison, these compounds have quite frequently been found in marine invertebrates (Goad 1981) and show high concentrations in a number of demosponges, such as *Penares tylostaster* (Bergquist et al. 1986) and *Terpios zeteki* (Delseth et al. 1979). However, the extreme predominance of saturated sterols in several of the hexactinellids studied (*Aulosaccus* cf. *mitsuk.*, *Sympagella* nov. sp., *Euplectella* sp.; see Table 1) is a most outstanding feature among the steroid patterns of living organisms.

It has been proposed that stanols originate from the transformation of dietary  $\Delta^5$  sterols (Goad 1981). For the Hexactinellida, we suggest a dietary uptake, unspecific transformation, and accumulation of external precursor sterols in an analogous manner. Indeed, the carbon number distributions found resemble those commonly observed for sterol mixtures from marine particulate matter (C<sub>26</sub> << C<sub>27</sub> > C<sub>28</sub> > C<sub>29</sub>, see Table 1, and e.g. Gagosian et al. 1982). These sedimentary patterns arise from the ubiquitous production of cholest-5-en-3 $\beta$ -ol by zooplankton and certain algae, whereas the less abundant C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub>  $\Delta^5$ -sterols are common in dinoflagellates, diatoms and green algae (Volkman et al. 1998).



**Fig. 2a–d** Proposed pathway of  $\Delta^5$ -stenol conversion with the intermediacy of 3-steroid ketones (modified after (Goat 1981; Nishimura 1982; Kok et al. 2000)). *In boxes*: proposed stereoselective route of  $\Delta^5$ -stenol transformation leading to 5 $\alpha$ (H)-stanols in the Hexactinellida, e.g. for cholesterol (cholest-5-en-3 $\beta$ -ol): **a** cholest-5-en-3 $\beta$ -ol, **b** cholest-4-en-3-one, **c** 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3-one, **d** 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol. **c'** 5 $\beta$ (H)-cholestan-3-one, **d'** 5 $\beta$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol

Steroid ketones are typically formed as transient intermediates during the biological and abiotic conversion of conventional  $\Delta^5$  sterols into stanols (Mackenzie et al. 1982; Kok et al. 2000) (Fig. 2). A possibility for distinguishing between a biogenic versus abiotic conversion pathway is the stereoselectivity of biologically mediated processes. This was shown for an anaerobic bacterium, which catabolizes cholesterol to 5 $\beta$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol (coprostanol) exclusively (Eyssen et al. 1973). Other work has demonstrated that some microorganisms and marine invertebrates (Astrophorida) convert cholesterol via cholest-4-en-3-one and 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3-one to 5 $\alpha$ (H)-cholestan-3 $\beta$ -ol (Smith et al. 1972; Taylor et al. 1981). Hence, the exclusive presence of 5 $\alpha$ (H)-isomers in hexactinellids points to a stereoselective, thus enzymatically driven, pathway of sterol transformation, operated either by the sponge exclusively or assisted by associated microorganisms.

The apparent overlap in steroid compositions among members of the class Hexactinellida virtually prevents further chemosystematic classifications at the intraclass level (Table 1). Nevertheless, our results suggest that neither de novo synthesis of steroids nor carbon skeleton

modifications are prevalent in these sponges. The simplicity and unspecific intra-class variability of hexactinellid sterols may be interpreted as a basic biochemical feature that underlines a deeply branching phylogenetic position for these sponges. However, it is unclear whether the sterols recorded have a discrete biological function or are just metabolic dead-ends accumulating upon an unspecific transformation of conventional marine sterols. Remarkably, even the biological function of sponge sterols in general is still a matter of debate. It has been shown that these compounds cannot modify the properties of phospholipid bilayers based on the unique  $\Delta^{5,9}$ -‘demospongiac acids’ (Djerassi and Lam 1991). Hence, the elucidation of the role of hexactinellid sterols and the precise characterization of the biochemical pathways which lead to their formation still require further study.

**Acknowledgements** We thank the crews of the R/Vs ‘Seward Johnson’, ‘Gwendoline May’, ‘Poseidon’, ‘Johnson-Sea-Link’ and ‘Jago’ for excellent collaboration during the field work. We are indebted to S. Pomponi, J. Reed and J. Reitner for providing the sponge samples and taxonomic classification, respectively. We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Th 713/1,2; Re 665/14–1) and the Bundesministerium für Bildung und Forschung for financial support. Three anonymous reviewers have greatly improved the quality of the original manuscript. This paper represents publication no. 11 of the research programme BOSMAN (03F0256A).

## References

- Adams CL, McInerney JO, Kelly M (1999) Indications of relationships between Poriferan classes using full-length 18S rRNA gene sequences. *Mem Queensl Mus* 44:33–43
- Aiello A, Fattorusso E, Menna M (1999) Steroids from sponges: recent reports. *Steroids* 64:687–714
- Bergquist PR (1985) Porifera relationships. In: Conway Morris S, George JD, Gibson R, Platt HM (eds) *The origins and relationships of lower invertebrates*. Clarendon Press, Oxford, pp 14–28
- Bergquist PR, Lavis A, Cambie RC (1986) Sterol composition and classification of the Porifera. *Biochem Syst Ecol* 14:105–112
- Bergquist PR, Karuso P, Cambie RC, Smith DJ (1991) Sterol composition and classification of the Porifera. *Biochem Syst Ecol* 19:17–24
- Brasier M, Green O, Shields G (1997) Ediacarian sponge spicule clusters from southwestern Mongolia and the origins of the Cambrian fauna. *Geology* 25:303–306
- De Rosa M, Minale L, Sodano G (1973) Metabolism in Porifera. II. Distribution of sterols. *Comp Biochem Physiol B* 46: 823–837
- Delseth C, Toleda L, Scheuer PJ, Wells RJ, Djerassi C (1979) 5 $\alpha$ -24-Norcholestan-3 $\beta$ -ol and (24Z)-stigmasta-5,7,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol: two new marine sterols from the Pacific sponges *Terpios zeteki* and *Dysidea herbacea*. *Helv Chim Acta* 62: 101–109
- Djerassi C, Lam W-K (1991) Sponge phospholipids. *Acc Chem Res* 24:69–75
- Djerassi C, Silva CJ (1991) Sponge sterols: origin and biosynthesis. *Acc Chem Res* 24:371–378
- Eyssen HJ, Parmentier GG, Comperolle FC, De Pauw G, Piessens-Denef M (1973) Biohydrogenation of sterols by *Eubacterium* ATCC21,408-*Nova* species. *Eur J Biochem* 36:411–421
- Fromont J, Kerr S, Kerr R, Riddle M, Murphy P (1994) Chemotaxonomic relationships within, and comparisons between, the orders Haplosclerida and Petrosia (Porifera: Demospongiae) using sterol complements. *Biochem Syst Ecol* 22:735–752

- Gagosian RB, Smith SO, Nigrelli GE (1982) Vertical transport of steroid alcohols and ketones measured in a sediment trap experiment in the equatorial Atlantic Ocean. *Geochim Cosmochim Acta* 46:1163–1172
- Gauvin A, Smadja J, Aknin M, Gaydou EM (1998) Cyclopropane-containing sterols in the marine sponge *Petrosia spheroida*. *Comp Biochem Physiol B* 121:451–456
- Gehling JG, Rigby JK (1996) Long expected sponges from the neoproterozoic Ediacara fauna of South Australia. *J Paleontol* 2:185–195
- Giner J-L (1993) Biosynthesis of marine sterol side-chains. *Chem Rev* 93:1735–1752
- Goad LJ (1981) Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure Appl Chem* 51:837–852
- Guella G, Mancini I, Pietra F (1988) Isolation of ergost-4,24(28)-dien-3-one from both Astrophorida demosponges and sub-Antarctic hexactinellides. *Comp Biochem Physiol B* 90:113–115
- Kerr RG, Baker B (1991) Marine sterols. *Nat Prod Rep* 8:465–497
- Kerr RG, Baker BJ, Kerr SL, Djerassi C (1990) Biosynthetic studies of marine lipids. XXIX. Demonstration of sterol side chain dealkylation using cell-free extracts of marine sponges. *Tetrahedron Lett* 31:5425–5428
- Kok MD, Rijpstra IC, Robertson L, Volkman JK, Sinnighe Damsté JS (2000) Early steroid sulfurisation in surface sediments of a permanently stratified lake (Ace Lake, Antarctica). *Geochim Cosmochim Acta* 64:1425–1436
- Mackenzie AS, Patience RL, Yon DA, Maxwell JR (1982) The effect of maturation on the configuration of acyclic isoprenoid acids in sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 46:783–792
- Mackie GO, Singla CA (1983) Studies on Hexactinellida. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe 1873). *Proc R Soc Lond B* 301:365–400
- Minale L, Sodano G (1974) Marine sterols: 19-nor-stanols from the sponge *Axinella polypoides*. *J Chem Soc Perkin Trans* 1:1888–1892
- Nishimura M (1982) 5 $\beta$ -isomers of stanols and stanones as potential markers of sedimentary organic quality and depositional paleoenvironments. *Geochim Cosmochim Acta* 46:423–432
- Reiswig HM (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). *Colloq Int CNRS* 291:173–180
- Reiswig HM, Mackie GO (1983) Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of Hexactinellida within the Porifera. *Philos Trans R Soc Lond B* 301:419–428
- Sica D, Zollo F (1978) Petrosterol, the major sterol with a cyclopropane side chain in the sponge *Petrosia ficiformis*. *Tetrahedron Lett* 9:837–838
- Smith AG, Goodfellow R, Goad LJ (1972) The intermediacy of 3-oxo steroids in the conversion of cholest-5-en-3 $\beta$ -ol into 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol by the starfish *Asterias rubens* and *Porania pulvillus*. *Biochem J* 128:1371–1372
- Taylor GD, Smith SO, Gagosian RB (1981) Use of microbial enrichments for the study of the anaerobic degradation of cholesterol. *Geochim Cosmochim Acta* 45:2161–2168
- Thiel V, Blumenberg M, Hefter J, Pape T, Pomponi SA, Reed J, Reitner J, Wörheide G, Michaelis W (2002) A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89:60–66
- van Soest RWM, Braekman JC (1999) Chemosystematics of Porifera: a review. *Mem Queensl Mus* 44:569–589
- Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansour MP, Sikes EL, Gelin F (1998) Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Org Geochem* 29:1163–1179