

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
IFM-GEOMAR
Leibniz-Institut für Meereswissenschaften

Diplomarbeit

**Aspekte der chemischen Verteidigung gegen Fouling
bei Makroalgen**

Kristina David

Februar 2009

Betreut durch Prof. Dr. Martin Wahl

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

- 1.1 Fouling und Epibiose
- 1.2 Verteidigung gegen Aufwuchs
- 1.3 Verwendete Organismen
- 1.4 Ziele der Arbeit

2. Material und Methoden

- 2.1 Untersuchungsgebiet und Organismen
- 2.2 Versuchsaufbau
- 2.3 Versuchsabbruch
 - 2.3.1 unbelebte Oberflächen
 - 2.3.2 belebte Oberflächen
- 2.4 Herstellung der Extrakte
 - 2.4.1 Oberflächenextrakte
 - 2.4.2 Gesamtextrakte
- 2.5 Verarbeitung der Extrakte
 - 2.5.1 Oberflächenextrakte
 - 2.5.2 Gesamtextrakte
- 2.6 Anzucht der Versuchsorganismen
 - 2.6.1 *Bacillus aquimaris*
 - 2.6.2 *Amphora spec.*
- 2.7 Plate Reader Messungen
- 2.8 Bioassays
 - 2.8.1 Vorversuche
 - 2.8.2 Extrakte
 - 2.8.2.1 Oberflächenextrakte
 - 2.8.2.2 Gesamtextrakte
- 2.9 Statistische Auswertung

3. Ergebnisse, Resultate

- 3.1 Erster Versuch (verschiedene Temperaturen)
 - 3.1.1 Unbelebte Oberflächen (Plättchen)

- 3.1.2 Oberflächenextrakte
- 3.1.3 Gesamtextrakte
- 3.2 Zweiter Versuch (Algen aus verschiedene Tiefen)

4. Diskussion

- 4.1 Effekt der Tiefe auf die Fouling-Verteidigung
- 4.2 Einfluss der Temperatur auf die Fouling- Verteidigung
- 4.3 Methodendiskussion
- 4.4 Zusammenfassung

Anhang: f/2 Medium

Danksagung

Erklärung

Literaturverzeichnis

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden verschiedene Aspekte der Verteidigung gegen Fouling von *F. vesiculosus* und *F. serratus* untersucht. Dazu wurden Oberflächenextrakte (im ersten Versuch auch Gesamtextrakte) hergestellt und diese in ihrer natürlichen Konzentration hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Ansiedlungs- und Wachstumsverhalten von Versuchsorganismen, einem marinen Bakterienstamm (*Bacillus aquimaris*) und einer Diatomeenart (*Amphora spec.*) getestet. Abiotischer Stress (eine Erhöhung und Erniedrigung der Temperatur, Lichtverfügbarkeit) hatte keinen Effekt auf die Fouling-Verteidigung, aber auf den Besiedlungsdruck, der mit steigender Temperatur zunahm. Biotischer Stress durch die Anwesenheit von Grazern (*Idotea baltica*) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Verteidigung gegen Fouling. Es gab keine Interaktion zwischen Fouling- und Fraßverteidigung. Die Ergebnisse der Bioassays zeigen, dass die Ansiedlung beider Versuchsorganismen und das Wachstum von *B. aquimaris* durch die Präsenz der Extrakte signifikant inhibiert wurden. Das Wachstum von *Amphora spec.* wurde durch die Extrakte nicht inhibiert und teilweise sogar gefördert. Das zeigt, dass bestimmte Stadien im Besiedlungsprozess beeinflusst wurden und nicht die Besiedlung an sich. Die Bioassays, die mit Hilfe des Plate-Readers durchgeführt wurden, lassen Aussagen über die Wirkung der Extrakte auf die Versuchsorganismen zu. Ein Nachteil ist jedoch, dass man nicht sagen kann um wie viel Prozent die Ansiedlung oder das Wachstum inhibiert wurde, da die Fluoreszenzwerte nicht proportional zur Zellzahl sind. Allgemeine Aussagen über die Wirkung der Extrakte sind aber zulässig und die Methode ist somit gut geeignet, um einen Überblick über das Antifouling-Potential von Algenextrakten auf verschiedene Foulingorganismen zu bekommen.

1. Einleitung

1.1 Fouling und Epibiose

Im marinen Milieu werden alle nicht verteidigten, exponierten Oberflächen früher oder später bewachsen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Fouling oder Epibiose und ist ein typisch aquatisches Phänomen (Wahl, 1989). Die Besiedlung neuer Oberflächen erfolgt meist recht schnell, da Hartsubstrat für sessile Organismen oft ein limitierender Faktor ist. Das Fouling-Sequenz Modell besagt, dass der Besiedlungsprozess neuer Oberflächen in vier Phasen unterteilt werden kann. Während die ersten beiden Besiedlungsschritte mehr von physikalischen Prozessen gesteuert werden, sind die letzten beiden Schritte der Besiedlung vor allem biologisch gesteuert (Wahl, 1989).

Während alle unbelebten Oberflächen, sofern sie nicht durch Antifouling-Anstriche geschützt sind, schnell von einem Biofilm überzogen werden (Callow & Callow, 2002), sind viele lebende Oberflächen von Algen und Tieren erstaunlich frei von Aufwuchs (Armstrong et al., 2000; Chambers et al., 2006). Das Interesse am Potential natürlicher Antifouling-Strategien mariner Organismen, zum Beispiel als Alternative zu den ökologisch bedenklichen Antifouling-Anstrichen, ist aus Sicht diverser mariner Industrien in den letzten Jahren stark gestiegen (Callow & Callow, 2002; Chambers et al., 2006; reviewed by Armstrong et al 2000; Bhadury & Wright, 2004). **Medizinisch, wirtschaftlich auch ?**

1.1.2 Besiedlungsprozess von Oberflächen

Der Besiedlungsprozess erfolgt in vier Phasen: Konditionierung, bakterielle Besiedlung, Ansiedlung einzelliger Eukaryoten und mehrzellige Eukaryoten (Wahl, 1989; Callow & Callow, 2002, Chambers et al., 2006). An eine eingetauchte Oberfläche lagern sich zunächst innerhalb von Sekunden Makromoleküle, hauptsächlich Glycoproteine, Polysaccharide und Proteoglycane, an (Wahl, 1989; Callow & Callow, 2002, Chambers et al., 2006). Nach dieser biochemischen Konditionierung durch die Adsorption von Makromolekülen folgt innerhalb von wenigen Stunden die bakterielle Besiedlung (Wahl, 1989; Callow & Callow, 2002, Chambers et al., 2006). Dabei kann man mehrere Phasen unterscheiden. Zunächst müssen die umher schwimmenden Bakterien sich der Oberfläche annähern, um sich im nächsten Schritt an ihr festsetzen zu können. Dazu muss als erstes in die 40 bis 100µm dicke viskose Grenzschicht, die alle Oberflächen umgibt, eingedrungen werden. Diese geschieht durch zufällige Mikroturbulenzen oder durch aktive Bewegungen der Bakterien (Wahl, 1989; Chambers et al., 2006). Nach dieser ersten

Annäherung an die Oberfläche beginnen physikalische Kräfte (Van-der-Waals Kräfte, elektrostatische Anziehung oder Abstoßung, Brownsche Molekularbewegungen) zwischen Bakterium und Oberfläche zu wirken (z.B.: Wahl, 1989; Chambers et al. 2006). Mit der Bildung von kovalenten Bindungen zwischen bakterieller Glykokalix und dem makromolekularen Oberflächenfilm geht die reversible Adsorptionsphase in die nicht mehr reversible Ansiedlung (Adhäsion) über (Wahl, 1989). Nach der erfolgreichen Ansiedlung auf der Oberfläche müssen die Bakterien dann wachsen, um sich dann auf der Oberfläche ausbreiten zu können, wobei ein komplexer Biofilm entsteht (Chambers et al. 2006). Auf die bakterielle Besiedlung folgt die der einzelligen Eukaryoten, wie zum Beispiel Diatomeen, Hefen und Protozoen. In den gemäßigten Breiten sind dies vor allem Diatomeen (Cuba & Blake, 1983), die sich mit Hilfe von Schleimsekretion an der Oberfläche ansiedeln (Ferreira & Seeliger, 1985; Callow & Callow, 2002). Nach einer Woche folgen dann mehrzellige Eukaryoten, Algensporen und meroplanktische Larven. So kann sich den Umständen entsprechend eine Fouling-Gemeinschaft etablieren.

1.1.3 Vor- und Nachteile von Fouling

Unkontrolliertes Fouling auf unbelebten Oberflächen wie zum Beispiel Schiffsrümpfen, verstärkt den Reibungseffekt und führt zu erhöhtem Treibstoffverbrauch. Das Wachstum mariner Organismen auf untergetauchten Oberflächen und die Beseitigung des Biofoulings kostet allein die US Navy \$ 1 Billion pro Jahr (Callow & Callow, 2002). In den letzten Jahren ist das Interesse an natürlichen Antifouling-Strategien, als Alternative zu den ökologisch bedenklichen Antifouling-Anstrichen aus Sicht diverser mariner Industrien stark gestiegen (Callow & Callow, 2002; Chambers et al., 2006; reviewed by Armstrong et al 2000; Bhadury & Wright, 2004).

Unkontrolliertes Fouling auf belebten Oberflächen hat viele oft verheerende Auswirkungen auf den Wirtsorganismus (Basibiont). So kommt es unter anderem zu einer Gewichtszunahme durch die Epibionten (Dixon et al, 1981), zu Beschattungseffekten (Sand-Jensen & Revsbech, 1987) und somit auch zu einer Einschränkung der Photosynthese (Littler & Littler, 1999), Nährstoffarmut, möglichen mechanischen Schäden oder einem erhöhten Gewebeverlust (Correa & Sanchez, 1996), Infektionen durch pathogene Bakterien (Littler & Littler, 1995) und zu vielen weiteren Nachteilen für den Bewachsenen. Epibionten können aber auch vorteilhaft für den Basibionten sein, indem sie zum Beispiel Herbivore durch ihren schlechten Geschmack abschrecken und dadurch den Fraßdruck auf die Alge reduzieren (Wahl & Hay, 1995; Karez et al., 2000).

Alle potentiellen Basibionten haben drei Möglichkeiten, um mit dem Fouling- Druck umzugehen, der mit Lokalität, Jahreszeit und Wassertiefe variiert: Toleranz,

Vermeidung oder Verteidigung. Viele Arten tolerieren einen gewissen Grad an Aufwuchs, andere vermeiden ihn durch Bewegungen in Zeit und Raum und einige verteidigen sich gegen den Bewuchs (Wahl, 1989). Aufgrund der vielen Nachteile, die Epibiose für die Basibionten mit sich bringen kann, herrscht ein Evolutionsdruck zur Entwicklung von Verteidigungsstrategien der Organismen gegen Aufwuchs (Wahl, 1989), denn wenn man besser gegen Aufwuchs verteidigt ist, hat man einen Vorteil gegenüber denen, die nicht so gut verteidigt sind. Viele marine Organismen sind erstaunlich frei von Epibionten (Armstrong et al., 2000; Chambers et al., 2006) im Vergleich zu unbelebtem Hartsubstrat, vermutlich aufgrund ihrer vielfältigen Verteidigungsstrategien gegen Fouling.

1.2 Verteidigung gegen Fouling

Es gibt drei Möglichkeiten von Verteidigungsmechanismen: mechanische, physikalische oder chemische, wobei diese häufig kombiniert werden (Wahl, 1989). Eine chemische Verteidigung durch extreme pH-Werte oder sekundäre Metabolite ist laut diversen Verteidigungstheorien wie zum Beispiel der ODH (optimal defense hypothesis; reviewed by Cronin, 2001) vermutlich kostenaufwendig, da die Energie für die Produktion solcher Substanzen nicht mehr für das Wachstum oder andere physiologische Prozesse zur Verfügung steht (Pavia et al., 1999; Honkanen & Jormalainen, 2005; Ianora et al., 2006). Dennoch scheint eine chemische Verteidigung ein gängiges Phänomen von Algen zu sein, die relativ frei von Epibionten und Krankheiten sind (Correa & Sanchez 1996; Armstrong et al., 2000; Nylund & Pavia, 2005). Solche Beobachtungen führten dazu, dass Algen beziehungsweise ihre Inhaltsstoffe auf ihr mögliches Potential als Antifouling-Substanzen hin untersucht wurden (Hellio et al., 2000, 2001; reviewed by Bhadury & Wright, 2004). In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für eine chemische Verteidigung von Algen gegen Epibionten und Fraßfeinde mit Hilfe von sekundären Metaboliten.

1.2.1 Verteidigungsmetabolite

Als sekundäre Metabolite bezeichnet man eine bemerkenswerte Vielzahl an Metaboliten, wie zum Beispiel Terpenoide, Alkaloide oder Phenole (reviewed by Faulkner, 1996), die keine offensichtliche Funktion im primären Stoffwechsel der Organismen spielen. Sie scheinen vielfache Funktionen zu haben und sind Bestandteil der Verteidigung gegen natürliche Feinde, wie zum Beispiel gegen

Herbivore oder Epibionten, und somit an der Vermittlung ökologischer Interaktionen beteiligt (Steinberg et al., 1997; Engel et al., 2002; Ianora et al., 2006).

Bei Braunalgen vermutet man, dass Phlorotannine, sekundäre phenolische Verbindungen, eine Bedeutung zukommt (Paul et al., 2006). Da diese relativ einfach zu messen sind (z.B. mit der Folin-Ciocalteu Methode), gibt es eine ganze Anzahl von Studien über die mögliche Rolle der Phlorotannine in Braunalgen. Sie sind zum Beispiel als Schutz vor schädlicher Sonneneinstrahlung oder UV-Strahlung im Gespräch (Pavia et al., 1997; Pavia & Toth, 2000; Henry & van Alstyne, 2004), ebenso als Bestandteil der chemischen Verteidigung gegen Fouling. Honkanen und Jormalainen (2005) untersuchten das Fouling auf *F. vesiculosus* und die genetische Variation in Toleranz und Widerstand gegen Fouling-Organismen. Die Phlorotanninkonzentrationen der Algen konnten hier nicht die Aktivität gegen Fouling erklären, ebenso wenig war die induzierbare Verteidigung gegen Fraß mit der Phlorotanninkonzentration in Bezug zu setzen (Honkanen & Jormalainen, 2005). Welche Bedeutung den Phlorotanninen bei der chemischen Verteidigung von Braunalgen zukommt, ist nach wie vor umstritten.

Sekundäre Metabolite können an der Vermittlung ökologischer Interaktionen an Oberflächen beteiligt sein. In welchen Konzentrationen sie dort vorliegen ist nicht hinreichend bekannt. De Nys et al. (1998) versucht als erstes eine Standardmethode zur Extraktion von Oberflächenmetaboliten von Algenoberflächen zu etablieren. Nylund et al. (2007) erweiterte diese „dipping“- Methode von de Nys et al. (1998), so dass es heute eine Methode zur Extraktion von unpolaren Oberflächenmetaboliten von Algenoberflächen gibt. Dadurch kann man die Oberflächenmetabolite in ökologisch relevanter Konzentration (de Nys et al., 1998) gegen ökologisch relevante Fouling-Organismen testen (Nylund et al. 2007) und vergleichbare Aussagen über die Wirkung der Metabolite treffen.

1.2.2 Chemische Verteidigung gegen die bakterielle Besiedlung

Mit der Ansiedlung von Bakterien, die im Wasser mit 10^6 Bakterien pro ml (Rheinheimer, 1995) allgegenwärtig sind, beginnt die Biofilmbildung auf allen Oberflächen. Algen besitzen eine Verteidigung gegen die bakterielle Besiedlung (reviewed by Steinberg et al., 1997; Engel et al., 2002). Viele Studien liefern Hinweise darauf dass sekundäre Metabolite eine Rolle in der chemischen Verteidigung gegen bakterielles Fouling spielen (Hellio et al., 2000, 2001; reviewed by Steinberg et al., 1997; Engel et al., 2002). So wurden Extrakte oder gereinigte Metabolite von marine Invertebraten (Slattery et al., 1995; Wahl et al., 1994) und Algen (Maximilien, 1995, 1998) zum einen gegen ökologisch relevante Bakterienstämme getestet und zum anderen in solchen Konzentrationen, in denen

die epiphytischen Bakterien ihnen wahrscheinlich ausgesetzt sind (de Nys et al. 1998; Dworjanyn et al., 2006; Nylund et al. 2007). Im Gegensatz zu unbelebten Oberflächen, für die Biofouling durchweg negative Konsequenzen hat und für marine Industrien ein kostenintensives Problem darstellt (Callow & Callow, 2002; Clare, 1996), können Bakterien auf belebte Oberflächen auch positive Effekte haben (Steinberg et al., 1997; Ianora et al., 2006).

Ein wichtiges Ergebnis vieler Studien ist, dass die chemischen Komponenten, die die höheren marinen Organismen produzieren, nicht einfach nur toxisch sind oder inhibierend auf das Wachstum von epiphytischen Bakterien wirken, sondern vielmehr selektiv gegen bestimmte Phänotypen der Bakterien wirken können (Maximilien et al., 1995). Es scheint Arten zu geben, die durch die Produktion nicht-toxischer sekundärer Metabolite die Zusammensetzung der epibiontischen Bakterien auf ihren Oberflächen kontrollieren und dadurch auch die weitere Besiedlung steuern. Ein gut untersuchtes Beispiel hier für ist die australische Rotalge *Delisea pulchra*, die im Vergleich zu anderen im Freiland vorhandenen Algen wenig bewachsen ist (Maximilien et al., 1995; Steinberg et al., 1997; Dworjanyn et al. 2006). Maximilien et al. (1995, 1998) untersuchte die Effekte von unpolaren, furanonhaltigen Extrakten auf den bakteriellen Besiedlungsprozess und fand heraus, dass die Extrakte bestimmte Phänotypen von Bakterien inhibierten, die die unterschiedlichen Stadien im bakteriellen Fouling-Prozess repräsentieren, nämlich schwimmende, sich ansiedelnde, wachsende und sich über die Oberfläche ausbreitende Bakterien. Das sekundäre Metabolite bestimmte Schritte im bakteriellen Besiedlungsprozess beeinflussen wurde in anderen Studien mit anderen marinen Organismen bestätigt (Wahl et al., 1994; Slattery et al., 1995; Kjelleberg & Steinberg, 2002).

Dieses Beispiel zeigt, dass sekundären Metaboliten viel bedeutendere Funktionen haben können als einfach wachstumshemmend oder toxisch zu wirken. So können Algen die Zusammensetzung der mit ihr assoziierten Bakterien regulieren und dadurch auch die Entwicklung des Biofilms mit bestimmter Abundanz und Zusammensetzung. Dies kann bedeutend sein, da bakteriellen Biofilmen eine Schlüsselfunktion bei der Ansiedlung nachfolgender Fouling-Organismen zukommt (Armstrong et al., 2000).

1.2.3 Einfluss von Stressoren auf die Fouling-Verteidigung

Als Stress bezeichnet man eine Belastungssituation, die in einem Organismus Abweichungen vom Normalverhalten auslöst (Larcher, 1987). Der belastende Faktor, der Stressor, kann abiotischer oder biotischer Natur sein. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Temperatur und der Lichtverfügbarkeit auf die Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* untersucht. Verschiedene Klimamodelle prognostizieren einen Anstieg

der Wassertemperatur für die Ostsee um bis zu 4°C (HELCOM, 2006). *F. vesiculosus* gilt als kalt temperierte Art, so dass der Temperaturanstieg sich vermutlich negativ auf die Physiologie und Verteidigung auswirken wird (Rohde, 2007). Ein Temperaturanstieg und die zunehmende Eutrophierung werden vor allem das Wachstum von Mikroalgen und Epibionten begünstigen (Korpinen et al., 2007). Dadurch wird die Lichtverfügbarkeit, die für die Tiefenzonierung von Makroalgen entscheidend ist, reduziert. Es ist bekannt, dass die Bestände von *F. vesiculosus* in der Ostsee in den letzten Jahren stark zurückgegangen sind, vermutlich aufgrund der zunehmenden Eutrophierung (Kautsky et al., 1986, Koie & Kristiansen, 2001; Vogt & Schramm, 1991) und der dadurch verminderten Lichtpenetration (Kautsky et al., 1986). Die tatsächliche Tiefenverbreitung von *F. vesiculosus* entspricht aber nicht der physiologisch möglichen Tiefenverbreitung (Rohde, 2007), so dass vermutet wird, dass andere Faktoren wie biotischer Stress durch Herbivore oder Epibionten ebenfalls Einfluss auf die Tiefenzonierung von *F. vesiculosus* haben (Rohde, 2007; Korpinen et al., 2007).

1.3 *Fucus vesiculosus*

Die umgangssprachlich auch Blasentang genannte Braunalge *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae, Fucales, Fucaceae, Linnaeus 1753) (siehe Abb.2), kommt in der Kieler Bucht meist auf Steinen, dem typisch ursprünglich eiszeitlichem Geröll, an oft wellenexponierten, aber auch ruhigeren Standorten vor. In Abhängigkeit vom Standort variiert der Blasentang äußerlich stark. Er wird bis zu einem Meter hoch und kann vier bis sechs Jahre alt werden (Koie & Kristiansen, 2001). In der westlichen Ostsee ist *F. vesiculosus* eine der bedeutendsten und am besten untersuchten Makroalgen im litoralen Lebensraum. Makroalgen wie *F. vesiculosus* spielen weltweit eine wichtige Rolle in vielen Küstenökosystemen. Sie dienen anderen assoziierten Organismen als Nahrungsquelle und Lebensraum.

1.3.1 Rückgang von *F. vesiculosus* in der Ostsee

In den letzten drei Jahrzehnten wurde ein starker Rückgang, um bis zu 95% der Biomasse, der *F. vesiculosus*-Populationen beobachtet (Schramm & Nienhuis, 1996). In den 40er Jahren kam *F. vesiculosus* noch in einer Wassertiefe von 12,5 Metern vor, in den 80er Jahren waren es nur noch 8,5 Meter (Koie & Kristiansen, 2001). Auch die maximale Tiefe im finnischen Bereich der Ostsee, in der *Fucus* auftritt, ist innerhalb von wenigen Jahren von 11,5m auf 8,5m zurückgegangen (Kautsky et al., 1986). In der Kieler Bucht ist das Verbreitungsgebiet von *F. vesiculosus* in den

letzten Jahren stark zurückgegangen und kommt nur noch in Wassertiefen bis zu 3 Metern vor (Fürhaupter et al., 2003, 2006). Die Tiefenverbreitung von *F. vesiculosus* wird vor allem durch die Lichtverfügbarkeit bestimmt. Der starke Rückgang der *F. vesiculosus*- Populationen ist auf die zunehmende Eutrophierung zurückzuführen (Kautsky et al., 1986, Koie & Kristiansen, 2001; Vogt & Schramm, 1991) und der dadurch bedingten Abnahme der Transparenz der Wassersäule, also einer verminderten Lichtpenetration (Kautsky et al., 1986).

Ein möglicher anderer Grund für den Rückgang könnte ein erhöhter Fraßdruck, besonders durch den herbivoren Isopoden *Idotea baltica* (siehe Abb.2) sein. *I. baltica* ist der bedeutendste Mesograzers in der Ostsee (Kangas et al., 1982) und ernährt sich vorwiegend von *F. vesiculosus* (Salema, 1987). Für *I. baltica* wurde eine Fraßpräferenz für *F. vesiculosus* im Vergleich zu anderen Makroalgen nachgewiesen, speziell gegenüber *F. evaneszenz* (Schaffelke et al., 1995; Jormalainen et al., 2001). Somit könnte auch der daraus resultierende Fraßdruck ein Grund für den Rückgang von *F. vesiculosus* in der litoralen Makroalgengemeinschaft sein (Kangas et al., 1982; Engkvist et al., 2000). Algen haben verschiedenste Strategien entwickelt, um mit Herbivorie umzugehen oder sich davor zu schützen (Rohde et al., 2004; Ianora et al., 2006). Als mögliche chemische Verteidigungsstoffe kommen viele sekundäre Metabolite in Frage. Bei Braunalgen und somit auch bei *F. vesiculosus* wird die Rolle der Phlorotannine als Komponenten der chemischen Verteidigung diskutiert, die Meinungen sind aber kontrovers.

1.4 Interaktion zwischen Fouling- und Fraß-Verteidigung

Jormalainen et al. (2008) untersuchte die genetische Variation im Widerstand gegen Epibiose und Herbivorie in *F. vesiculosus*, unter Bedingungen in denen beide Feinde koexistierten und in denen sie separat vorhanden waren. *F. vesiculosus* zeigte große genetische Variation im Widerstand gegen Epibiose und Herbivorie und der Fraßdruck auf die Algen war in Anwesenheit von Epibionten geringer als in deren Abwesenheit (Jormalainen et al., 2008). Die Verteidigung von *F. vesiculosus* gegen Epibiose und Herbivorie waren unabhängig voneinander wenn sie getrennt gemessen wurden, aber positiv miteinander korreliert wenn beide Feinde koexistierten (Jormalainen et al., 2008). Während Jormalainen et al. (2008) also eine Kopplung der Verteidigung gegen Fouling und Herbivore vermutet, konnte Rhode (Dissertation, 2007) dies nicht nachweisen. Eine induzierbare Verteidigung gegen Herbivore in Makroalgen ist aber mittlerweile nachgewiesen (Rohde et al., 2004, 2007; Toth et al., 2005; Hemmi et al., 2004; Kubanek et al., 2004), welche sekundären Metabolite dabei eine Rolle spielen nicht. Es ist bekannt, dass

Epibionten den Fraßdruck auf ihre Wirte verstärken können, indem sie Grazer durch ihre Schmackhaftigkeit anziehen, auch bekannt als „shared doom“ (Wahl & Hay, 1995) oder „co-consumption“ (Karez et al., 2000). Den gegenteiligen Effekt, dass Epibionten den Fraßdruck auf ihren Wirt durch ihre Ungenießbarkeit vermindern, bezeichnet man als „associational resistance“ (Wahl & Hay, 1995) oder auch als „protective coating“ (Karez et al., 2000).

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus*, im zweiten Versuch vergleichend mit der von *F. serratus* (siehe Abb.2), unter verschiedenen Punkten betrachtet werden. Im ersten Versuch wurden *F. vesiculosus* Individuen für zwei Wochen bei fünf verschiedenen Temperaturen (8, 12, 16, 21, 23°C) gehältert, um zu schauen ob sich eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur auf die Verteidigung gegen Fouling auswirkt. Zusätzlich zu dem abiotischem Stress (Temperatur) wurde die eine Hälfte der *F. vesiculosus* Individuen biotischem Stress durch Grazer (*I. baltica*) ausgesetzt, um die Fraßverteidigung zu induzieren. Generell induziert *Idotea baltica* nach 10 Tagen eine Fraßabwehr bei *Fucus vesiculosus* (Rohde & Wahl, 2007). Dies wurde getan, um zu schauen ob die Verteidigung gegen Fouling und gegen Fraß miteinander gekoppelt oder getrennt voneinander zu betrachten sind (Jormalainen, 2008). Zusätzlich wurden unbelebte Oberflächen mit in die Aquarien gehängt, um zu schauen ob es bei verschiedenen Temperaturen einen Unterschied zwischen der Menge an Aufwuchs, also dem vorhandenen Besiedlungsdruck, gibt.

Im zweiten Versuch wurden *F. vesiculosus* und *F. serratus* Individuen aus verschiedenen Tiefen gesammelt und getestet, ob die Tiefe und somit auch die Lichtverfügbarkeit einen Einfluss auf die Fouling-Verteidigung der beiden Algenarten hat und ob sich diese zwischen den beiden Arten unterscheidet oder nicht. Um die Fouling-Verteidigung der Algen zu untersuchen wurden Oberflächenextrakte, im ersten Versuch auch Gesamtextrakte, hergestellt. Zur Extraktion wurde ein Hexan-Methanol Gemisch verwendet, um sowohl unpolare als auch polare Oberflächen-, bzw. Inhaltsstoffe der Algen zu extrahieren. Um die Fouling-Verteidigung der Algen zu überprüfen, wurden die Extraktbestandteile in ihrer natürlichen Konzentration hinsichtlich ihrer Wirkung auf zwei verschiedene Versuchsorganismen, ein mariner Bakterienstamm (*Bacillus aquimaris*) und eine Diatomeenart (*Amphora spec.*), getestet.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiet und verwendete Organismen



Abb. 1: Kieler Förde, Sammelgebiete der Versuchsorganismen markiert

Für beide Versuche wurden Organismen aus der Kieler Bucht (siehe Abb.1) verwendet. Die Kieler Bucht liegt in der Beltsee (Rheinheimer, 1995), einem Teil der westlichen Ostsee und ist ein flaches, ca. 2500 km² großes, brackisches Wasserareal (Babenerd & Gerlach, 1987). Jahreszeitliche Schwankungen der Temperatur zwischen 1-20°C und der Salinität zwischen 12-20 PSU sind hier aufgrund der Lage zwischen Nordsee und zentraler Ostsee keine Seltenheit (BSH, 2008).

Charakteristisch für dieses Gebiet sind auch die verstreuten glazialen Felsen, Geröll und Steine in der sublitoralen Zone (Rheinheimer, 1995). Diese charakteristische Geographie dient als Hartsubstrat für die hier untersuchten Makroalgen *Fucus vesiculosus* und *Fucus serratus*.



Abb. 2: in den Versuchen verwendete Organismen, *Fucus serratus* (links), *Fucus vesiculosus* (mittig), *Idotea baltica* (rechts).

Die baltische Klippassel *Idotea baltica* (Malacostrata, Isopoda, Pallas 1772) (siehe Abb.2) wird bis zu 3cm lang, hat einen ovalen abgeflachten Körper. Die Farbe der Klippasseln variiert stark, von grünlich, rötlich bis braun; der Körper kann mit oder

ohne Längsstreifen sein. Während des Tages sitzen Klippasseln gerne auf Seegras oder Algen, vor allem in *F. vesiculosus* Beständen, nachts schwimmen sie aktiv umher (Koeie & Kristiansen, 2001). Der ebenfalls zu den Braunalgen gehörende Sägetang *Fucus serratus* (Phaeophyceae, Fucales, Fucaceae, Linnaeus 1753) (siehe Abb.2) verträgt nur gelegentliches Trockenfallen und wächst somit in etwas tieferen Bereichen als *F. vesiculosus*. Der Sägetang kommt in ein bis fünf Meter Wassertiefe in dichten Beständen vor, gelegentlich auch bis zu zehn Metern (Koeie & Kristiansen, 2001), wenn passendes Hartsubstrat vorhanden ist.

Die für den ersten Versuch benötigten *Fucus vesiculosus* Individuen wurden im Mai 2008 nahe Strände, im Uferbereich des Bülker Leuchtturms ($54^{\circ}27'2''N$; $010^{\circ}11,8''O$; siehe Abb.1) bei einer Wassertemperatur von $14^{\circ}C$ gesammelt und in Behältern mit Ostseewasser zu den Klimäräumen des IFM-GEOMAR transportiert. Dort wurden die Algenindividuen in die Einzelaquarien gesetzt (siehe 2.2 Versuchsaufbau). Die für den Versuch benötigten Idoteen wurden, aufgrund ihrer dort erhöhten Abundanz, in einer Seegraswiese vor dem Falkensteiner Strand ($54^{\circ}24',1''$; $010^{\circ}11,2''O$; siehe Abb.1) gefangen. Dieses geschah während einer Ausfahrt mit dem Forschungsschiff „Polarfuchs“ durch mehrmaliges Dredgen. Die Idoteen wurden in Behältern mit Ostseewasser zu den Klimäräumen des IFM-GEOMARs gebracht und wie im Versuchsaufbau beschrieben einen Tag später als die Algen in die Einzelaquarien gesetzt (siehe 2.2).

Die für den zweiten Versuch benötigten *Fucus vesiculosus* und *Fucus serratus* Individuen wurden Anfang September 2008 auch im Bereich des Bülker Leuchtturms ($54^{\circ}27'2''N$; $010^{\circ}11,8''O$; siehe Abb.1) von Forschungstauchern aus verschiedenen Wassertiefen gesammelt. Es wurden jeweils fünf Replikate von *Fucus serratus* aus 0m, 1m und 2m Wassertiefe geholt, während *Fucus vesiculosus* nur in Wassertiefen von 0m und 1m vorkam. Die Algenindividuen wurden separat eingetütet und zum IFM-GEOMAR transportiert und dort direkt verarbeitet (siehe 2.4.1 Oberflächenextrakte). Die Wassertemperatur zum Zeitpunkt der Probennahme betrug ca. $18^{\circ}C$.

2.2 Versuchsaufbau

Da die für den zweiten Versuch verwendeten Algen direkt verarbeitet wurden (s.o), wird hier nur der Versuchsaufbau des ersten Versuches beschrieben.

Im ersten Versuch sollten die *Fucus vesiculosus* Individuen zwei Wochen lang bei fünf verschiedenen Temperaturen gehältert werden, um zu schauen, ob sich die Temperatur bzw. eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur auf die Fouling-Verteidigung auswirkt. Dazu wurde der Versuch in vier verschiedenen Klimäräumen

(A112, A105, A116, A07) des IFM-GEOMAR aufgebaut; in einem der Räume (A07) wurden also zwei verschiedene Temperaturen eingestellt. Vor Versuchsbeginn wurden pro Temperatur 12 Einzelaquarien (2 Liter, Durchfluss: 0,25L/Std.) aufgebaut. Diese wurden mit Hilfe von Infusionsschläuchen, die von einem erhöhten Vorlaufbecken ausgingen, mit gefiltertem Seewasser aus der Kieler Förde versorgt. Jedes Einzelaquarium hatte eine separate Sauerstoffversorgung (siehe Abb.3). Um die Temperaturen so niedrig bzw. so hoch wie möglich einzustellen, wurden entweder zusätzliche Vorlaufbecken zur Kühlung (A105, A116) aufgebaut, oder das Wasser im Vorlaufsystem mit Hilfe von Heizstäben erwärmt (A07). Vor und während des Versuches wurden folgende Temperaturen in den Einzelaquarien gemessen: 8°C (A105), 12°C (A116), 16°C (A112), 21°C (A07) und 23°C (A07). Die Aquarien wurden mit einer Lichtintensität von ca. $70\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}^{-1} \pm 5\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}^{-1}$ (Li-Cor 1400) beleuchtet (Lichtquelle: Osram Fluora L 36 W 177 25xl, entspricht ca. $14,24 \pm 0,04\text{ W}/\text{m}^2$) und ein 16:8 Licht-Dunkelrhythmus, wie er im Freiland zur Zeit der Probenahme existierte, eingestellt. Zur Kontrolle wurden die Temperatur- und Lichtdaten während des Versuches mit Hilfe von Temperatur- und Lichtloggern (HOBO-Pendant-Datenlogger) aufgezeichnet (pro Temperatur zwei Logger).



Abb. 3: Versuchsaufbau beispielhaft für eine Temperatur; 12 Einzelaquarien pro Temperatur, 6 Replikate, geteilt in unbefressen und befressen (mit Idoteen). Zusätzlich befanden sich unbelebte Oberflächen in jedem Aquarium.

Pro Temperatur wurden sechs Replikate, geteilt in jeweils zwei Hälften, in die Einzelaquarien gesetzt (siehe Abb.3). Die eine Hälfte wurde nicht befressen (unbefressen = ohne Idoteen), der andere Teil des Algenindividuums wurde befressen (befressen = 8 Idoteen pro Aquarium). Die Idoteen wurden einen Tag

später in die Aquarien gesetzt als die Algen. Pro Temperatur wurden also sechs Replikate (geteilt in unbefressen und befressen) gehältert, insgesamt wurden 60 Einzelaquarien mit Algen (Hälfte befressen, andere Hälfte unbefressen) bestückt. Als unbelebte Oberflächen wurden ausgestanzte Plättchen (Durchmesser: 14mm) aus transparenter Kopierfolie in die Ecken der Aquarien gehängt. Der Versuch wurde über 14 Tage laufen gelassen, die Plättchen wurden allerdings schon nach 13 Tagen entfernt; dann erfolgte der Versuchsabbruch.

2.3 Versuchsabbruch

Nach 13 Tagen wurden zunächst die unbelebten Oberflächen (Plättchen aus Kopierfolie) aus den Aquarien entfernt, nach 14 Tagen die Algenindividuen. Die für den zweiten Versuch verwendeten Algen aus verschiedenen Tiefen wurden direkt nach dem Sammeln verarbeitet (siehe 2.4.1 Oberflächenextrakte).

2.3.1 unbelebte Oberflächen (Plättchen):

Die unbelebten Oberflächen wurden mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus den Aquarien entfernt. Die Plättchen wurden in drei durchsichtige 24 Multiwell-Platten gelegt, jedes Plättchen in ein eigenes well. Als Kontrollen dienten frisch ausgestanzte Plättchen, die auch in die Multiwell-Platten gelegt wurden. In jedes mit Plättchen belegtes well wurden 1,5ml filtriertes, steriles Seewasser (FSW) hinzu gegeben. Dann wurde zunächst die Absorption (477-491nm) mit Hilfe des Plate Readers (siehe 2.7 Plate Reader Messungen) gemessen, um zu schauen wie viel Licht durch den vorhandenen Aufwuchs absorbiert wurde. Anschließend wurden Abstriche der Plättchen mit sterilen Q-Tipps gemacht. Diese wurden dann in Eppendorf-tubes mit 1,6ml FSW überführt, verschlossen und für 10sec. gevortext. Danach wurden je 200µl der jeweiligen Probe, je dreimal repliziert, in schwarze 96 Multiwell-Platten überführt. Dann wurde zunächst die Chlorophyll-Fluoreszenz (Ex.: 485nm, Em.: 677nm) mit Hilfe des Plate Readers (siehe 2.7) gemessen. Anschließend wurde in jedes well 50µl Syto9 hinzu gegeben und die Multiwell-Platten abgedunkelt hingestellt. Nach 15minütiger Einwirkzeit wurde die Syto9-Fluoreszenz (Ex.: 477-491nm, Em.: 540nm) mit Hilfe des Plate Readers (siehe 2.7) gemessen.

2.3.2 belebte Oberflächen (Algen):

Nach 14 Tagen wurden dann die 60 Algenindividuen (fünf verschiedene Temperaturen, jeweils sechs Replikate, geteilt in unbefressen und befressen) aus

ihren Aquarien entnommen und separat eingetütet. Dann wurden zunächst Oberflächenextrakte nach der „dipping“- Methode von de Nys et al. (1998), erweitert von Nylund et al. (2007), von jeder Alge hergestellt (siehe 2.4.1 Oberflächenextrakte). Anschließend wurden von denselben Algenstücken die Gesamtextrakte hergestellt (siehe 2.4.2 Gesamtextrakte).

2.4 Herstellung der Extrakte

Von den Algen des ersten Versuches (verschiedene Temperaturen) wurden nach Versuchsabbruch sowohl Oberflächen- als auch Gesamtextrakte hergestellt. Von den Algen des zweiten Versuches wurden unmittelbar nach Probennahme lediglich Oberflächenextrakte hergestellt. Zur Extraktion der Oberflächenmetabolite und der gesamten Inhaltsstoffe wurde ein Lösungsmittel-Gemisch aus Hexan und Methanol benutzt, um sowohl unpolare als auch polare Substanzen zu extrahieren.

2.4.1 Oberflächenextrakte:

Zur Herstellung des jeweiligen Oberflächenextraktes wurde beim ersten Versuch (verschiedene Temperaturen), wenn möglich, ca.10g Alge genommen und in einer Salatschleuder (10 Umdrehungen) so gut wie möglich vom aufsitzenden Wasser befreit, also getrocknet und dann gewogen (Frischgewicht der Alge in g). Danach wurde die jeweilige Alge in ein 1:1 Hexan-Methanol Gemisch (so das die Alge vom Lösungsmittelgemisch umgeben war) eingetaucht und für 10s extrahiert, ohne die Zellen der Algenoberfläche zu beschädigen. Während der Extraktionszeit wurde das Gemisch gut geschüttelt, um die zwei Phasen zu mischen. Anschließend wurden die Extrakte abfiltriert und in lösungsmittelbeständigen Flaschen zwischengelagert (Kühlschrank, -20°C). Aus denselben Algenindividuen wurden dann die Gesamtextrakte (siehe 2.4.2 Gesamtextrakte) hergestellt (de Nys et al., 1998; Nylund et al., 2007).

Beim zweiten Versuch (verschiedene Tiefen) wurden lediglich Oberflächenextrakte aus den jeweiligen Algenindividuen hergestellt. Dazu wurden nur die Thallusspitzen der jeweiligen Algen verwendet. Diese wurden ebenfalls vom anhaftenden Wasser so gut wie möglich befreit (Salatschleuder, 10 Umdrehungen). Anschließend wurden die Thallusspitzen ebenso extrahiert wie die Algen (siehe oben). Dann wurden die Extrakte abfiltriert und in lösungsmittelbeständigen Flaschen zwischengelagert (Kühlschrank, -20°C).

2.4.2 Gesamtextrakte:

Zur Herstellung der Gesamtextrakte (nur beim ersten Versuch, verschiedene Temperaturen) wurden die gleichen Algenindividuen verwendet wie zur Herstellung der Oberflächenextrakte (de Nys et al., 1998; Nylund et al., 2007). Dazu wurde die jeweilige Alge über Nacht in einem 1:1 Hexan-Methanol Gemisch (so das die Alge vom Lösungsmittelgemisch umgeben war) auf dem Schütteltisch (GFL 3015) bei maximaler Rotation extrahiert. Anschließend wurden die Gesamtextrakte abfiltriert und ebenso wie die Oberflächenextrakte in lösungsmittelbeständigen Flaschen zwischengelagert (Kühlschrank, -20°C).

2.5 Verarbeitung der Extrakte

Der jeweilige Extrakt wurde zur weiteren Verarbeitung in einen Rundkolben umgefüllt. Dann wurde das Lösungsmittelgemisch mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Heidolph, Laborota 4000 mit Vakuumkontrolleinheit) bei 30°C vollständig verdampft. Das während des Eindampfens benötigte Vakuum wurde mittels einer Vakuum-Membranpumpe (KNF LAB Laboport) erzeugt. Dann wurden die Rundkolben, an deren Wänden sich die extrahierten Stoffe befanden, über Nacht im Gefriertrockner bei - 80°C und 10µbar (VirTis Gefriertrockner und Vacuubrand Pumpe oder CHRIST Gefriertrockener und Vacuubrand Pumpe) getrocknet, um das restliche Wasser vollständig zu entziehen. Danach wurden die Extraktbestandteile in den Kolben mit je 2ml Lösungsmittelgemisch (1ml Hexan + 1ml Methanol) angelöst und der jeweilige Hexananteil verdampft. Der Rest (Extrakt in Methanol) wurde in vorher gewogenen Vials umgefüllt und das restliche Methanol im Konzentrator (Eppendorf, concentrator 5301) komplett verdampft. Anschließend wurden die Vials erneut, diesmal mit den extrahierten Stoffen, gewogen (Vials leer [g] - Vials voll [g] = Extraktmenge [g]). Die jeweiligen Extraktbestandteile in den Vials wurden dann für die Bioassays (siehe 2.8) mit den beiden Versuchsorganismen (siehe 2.6) in DMSO angelöst. Um das Volumen an DMSO zu erhalten, mit dem der jeweilige Oberflächen- oder Gesamtextrakte angelöst werden sollte, wurde zunächst das extrahierte Volumen berechnet (siehe 2.5.1 Oberflächenextrakte, 2.5.2 Gesamtextrakte), was der natürliche Konzentration entspricht. In dieser sollten die Extrakte in den Bioassays verwendet werden. Die Vorversuche (siehe 2.8.1 Vorversuche) zeigten, dass DMSO in Konzentrationen > 5% toxisch auf die Versuchsorganismen wirkte, daher wurden die jeweiligen Extraktbestandteile in den Vials mit nur 5% DMSO des zukünftigen Gesamtvolumens in den wells, bezogen auf das jeweilige extrahierte Volumen, angelöst. Mit den in DMSO angelösten Oberflächen- und Gesamtextrakten wurden dann Ansiedlungs- und Wachstumsversuche mit zwei verschiedenen

Versuchsorganismen (siehe 2.8 Bioassays) durchgeführt, um zu schauen, ob sich die Extrakte inhibierend auf die Prozesse auswirkten oder nicht.

2.5.1 Oberflächenextrakte:

Um das dazuzugebende Volumen an DMSO zu erhalten, mit welchem die jeweiligen Oberflächenextrakte angelöst werden sollten, wurde zunächst die extrahierte Oberfläche der jeweiligen Alge wie folgt berechnet:

Das jeweilige Frischgewicht der Algen (V_a) wurde zunächst in die entsprechende Oberfläche umgerechnet (1g Alge entspricht ca. $21,5\text{cm}^2$ Algenoberfläche, laut M. Wahl in Absprache mit T. Lachnit) und mit der Extraktionstiefe (Annahme: ca. $30\mu\text{m}$, M. Wahl in Absprache mit T. Lachnit) multipliziert. Daraus resultierte das extrahierte Volumen (V_e), was annäherungsweise der natürlichen Konzentration der Extrakte entspricht. Bezogen auf das Gesamtvolumen (siehe 2.8. Bioassays) im zukünftigen well (z.B.: $50\mu\text{l} = 100\%$) darf der Anteil an DMSO höchstens 5% betragen, da DMSO in höheren Konzentrationen toxisch auf die verwendeten Versuchsorganismen wirkte (siehe 2.8.1 Vorversuche). $\text{DMSO-Zugabe } [\mu\text{l}] = V_e [\mu\text{l}] / 100 \times 5 \rightarrow$ Menge an DMSO $[\mu\text{l}]$, mit der der jeweilige Extrakt angelöst wurde. Das zuzugebende Volumen an DMSO schwankte also mit dem extrahierten Volumen der jeweiligen Alge. Aufgrund sonst sehr geringer zu pipetierender Extraktmengen (in DMSO gelöst) wurden die Oberflächenextrakte mit FSW „gestreckt“ ($V_e - \text{DMSO-Anteil}/2$). Daraus resultierte die Zugabe von $25\mu\text{l}$ Extrakt (in DMSO + FSW gelöst) + $25\mu\text{l}$ Suspension (Bakterien oder Diatomeen) pro well ($50\mu\text{l}$ Gesamtvolumen) in den Bioassays (siehe 2.8.2.1 Oberflächenextrakte).

2.5.2 Gesamtextrakte:

Zur Berechnung der DMSO- Zugabe zu dem jeweiligen Gesamtextrakte diente die Annahme, dass das Frischgewicht der jeweiligen Alge ungefähr ihrem Volumen (Volumen Alge = V_a) und damit dem Extraktionsvolumen entspricht. Vom Gesamtvolumen (z.B.: $100\mu\text{l} = 100\%$) in den zukünftigen wells durfte der Anteil an DMSO höchstens 5% betragen (siehe 2.8.1 Vorversuche), da DMSO in höheren Konzentrationen toxisch auf die Versuchsorganismen wirkte. $\text{DMSO-Zugabe } [\mu\text{l}] = V_a [\mu\text{l}] / 100 \times 5 \rightarrow$ Menge an DMSO $[\mu\text{l}]$, mit der der jeweilige Extrakt angelöst wurde. Das zuzugebende Volumen an DMSO schwankte also mit dem extrahierten Volumen der jeweiligen Alge.

2.6 Anzucht der Versuchsorganismen für die Bioassays (*Bacillus aquimaris*, *Amphora spec.*)

Als Versuchsorganismen wurden ein mariner Bakterienstamm (*Bacillus aquimaris*) und eine Diatomeenart (*Amphora spec.*) verwendet. Mit der Wahl dieser Versuchsorganismen wurde *B. aquimaris* als Vertreter für den zweiten Schritt (bakterielle Besiedlung) und *Amphora spec.* als Vertreter für den dritten Schrittes (Besiedlung durch einzellige Eukaryonten) des Fouling-Sequenz Modells ausgewählt, wobei in den Biossays zwischen der Ansiedlung oder dem Festsetzen der Versuchsorganismen und deren Wachstum unterschieden wurde. Mit den Versuchsorganismen wurden zunächst Vorversuche (Verdünnungsreihen, DMSO-Eichreihen) durchgeführt, anschließend wurden die Oberflächenextrakte beider Versuche und die Gesamtextrakte des ersten Versuches hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Ansiedlungs- und Wachstumsverhalten der beiden Versuchsorganismen getestet.

2.6.1 *Bacillus aquimaris*:

Für die Anzucht des Bakterienstammes wurde zunächst ein Grundmedium (ohne Agar: 3g Hefe + 5g Pepton auf 1L filtriertes Seewasser) hergestellt. Die Bestandteile wurden gut durchmischt und auf kleine Erlenmeier-Kolben (pro Kolben ca. 50-100ml) verteilt und autoklaviert. Nach ausreichender Abkühlung des autoklavierten Grundmediums wurde dieses mit einer *Bacillus aquimaris*-Bakterienkultur (aus Schrägagar-Kultur, Grundmedium mit Agar) angeimpft. Dazu wurde eine Impföse 10s mit Hilfe einer Bunsenbrennerflamme ausgeglüht, 20s gewartet (bis zur Abkühlung) und anschließend ein Teil der Zellkultur aus der Schrägagar-Kultur entnommen und zum autoklavierten Medium hinzu gegeben. Auf diese Weise wurden mehrere Erlenmeyer-Kolben angeimpft, ein Teil des Mediums, welches als Kontrolle dienen sollte, wurde nicht angeimpft. Die Kolben wurden dann auf einen Schütteltisch (140rpm) im Inkubator (Sanyo, Incubator MIR – 153) bei 28°C für 24 Stunden wachsen gelassen. Für die Ansiedlungs- bzw. Festsetzungsversuche wurde die über 24 Stunden gewachsene Kultur unverdünnt benutzt, für die Wachstumsversuche wurde die Kultur 1:10 mit sterilem Seewasser verdünnt (siehe 2.8 Bioassays).

2.6.2 *Amphora spec.*:

Für die Anzucht der Diatomeenkultur wurde 1L filtriertes Seewasser autoklaviert. Nach ausreichender Abkühlung des FSW wurden die fünf Lösungsbestandteile des

f/2 Mediums (siehe Anhang, A.1 f/2 Medium) dazu gegeben, sowie 1ml der *Amphora*-Stammlösung.

Das angeimpfte f/2 Medium wurde dann im Klimaraum (16°C) der Hohenbergstr.2 an eine Sauerstoffversorgung angeschlossen und wachsen gelassen. Für die Wachstumsversuche wurde die Kultur 48 Stunden wachsen gelassen, für die Ansiedlungsversuche 120 Stunden.

2.7 Plate Reader Messungen

Alle Einstellungen und Messungen am Plate Reader wurden mit Hilfe der Software MikroWin Hidex 2000 durchgeführt. Mit Hilfe des Plate Readers (siehe Abb.4) kann man Messungen der Lumineszenz, Fluoreszenz und Absorption mittels optischer Filter durchführen.



Abb. 4 : Plate Reader (Hidex, Plate Chameleon V, 425-106 Multilabel Counter)

Für alle Messungen mit dem Plate Reader (Hidex, Plate Chameleon V, 425-106 Multilabel Counter) wurden die Proben in Multiwell-Platten (Brandplates, 24-well transparent oder 96-well schwarz) einpipettiert. Für die Absorptionsmessungen (nur unbelebte Oberflächen, erster Versuch, siehe 2.3.1 unbelebte Oberflächen) wurden transparente 24-Multiwell-Platten benutzt, in deren wells die Plättchen genau hinein passten. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 477-491nm gemessen (Transmission entspricht 1 – Absorption). Für alle Fluoreszenzmessungen (siehe 2.8 Bioassays) wurden schwarze 96 Multiwell-Platten verwendet. Die Fluoreszenz-Messungen wurden bei folgenden Wellenlängen durchgeführt:

	Excitation [nm]	Emission [nm]
Chlorophyll-Fluoreszenz	485	677

Syto9-Fluoreszenz	477-491	540
-------------------	---------	-----

Tabelle 1: Excitations- und Emissionswellenlängen für die Fluoreszenz-Messungen mit dem Plate Reader

Die Unterschiede zwischen Kontrollwells ohne Extrakte und solchen mit Extrakten sollten bei den Ansiedlungs- und Wachstumsversuchen mit der Diatomee *Amphora spec.* ursprünglich mittels Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen werden. Bei der ersten Messung mit den Extrakten zeigte sich aber, dass das Chlorophyll in den Extraktkontrollen so stark fluoreszierte, dass keine weiteren Aussagen möglich waren. Deshalb wurden alle wells mit Syto9 angefärbt, so wie bei den Versuchen mit *B. aquimaris* und dann gemessen (siehe Tab.1). Es wurde also nur bei den Abstrichen der unbelebte Oberflächen die Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen (siehe 2.3.1 unbelebte Oberflächen). Für die Messung der relativen Zelldichten von *B. aquimaris* und *Amphora spec.* in den wells nach Abschluss der Biosassays wurden diese mit Syto9 (Molecular Probes, SYTO Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains), einem grün fluoreszierendem Nukleinsäuren-Farbstoff, angefärbt, die Multiwell-Platten im Dunkeln inkubiert und dann die Fluoreszenz (siehe Tab.1) gemessen.

2.8 Bioassays

Um heraus zu finden, in welchen Zelldichten die Kulturen für die bevorstehenden Versuche am besten geeignet sind, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Zum einen wurden Verdünnungsreihen mit beiden Versuchsorganismen durchgeführt, zum anderen DMSO-Eichreihen, um die Toxizität von DMSO zu überprüfen. Außerdem wurde die Diatomeenkultur mit Syto9 gefärbt, im Dunkeln inkubiert, und dann zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, um zu schauen, ob und wann die Zellen gefärbt wurden, oder ob sie nach verschieden langer Einwirkzeit unterschiedlich stark fluoreszierten. Die Ergebnisse der Vorversuche werden nicht im Ergebnisteil dargestellt, sondern in 2.8.1. beschrieben.

Nach den Vorversuchen konnten dann die Algenextrakte aus beiden Versuchen in ihrer natürlichen Konzentration (siehe 2.5) hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Ansiedlungs- und Wachstumsverhalten der beiden Versuchsorganismen (siehe 2.6) getestet werden.

2.8.1 Vorversuche:

Zuerst wurden Verdünnungsreihen mit den Kulturen beider Versuchsorganismen (*Bacillus aquimaris*, *Amphora spec.*) mit FSW (1:10) hergestellt, um zu schauen in welchen Zelldichten sich diese für die geplanten Versuche am besten eignen. Die Anzucht von *Bacillus aquimaris* erfolgte wie oben (siehe 2.6.1) beschrieben. Die über 24 Stunden in den Erlenmeyer- Kolben gewachsenen Kulturen wurden in einem großen Kolben vermengt. Dann wurde von der Ausgangskultur eine Verdünnungsreihe (1:10) mit FSW hergestellt. Anschließend wurden die fünf Verdünnungsstufen (unverdünnt bis 1:10000) in eine schwarze 96 Multiwell-Platte einpipettiert (Gesamtvolumen pro well: 50µl, jeweils 12mal repliziert). Dann wurde zu allen wells Syto9 (25µl) dazu gegeben, die Platten für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Fluoreszenz mit Hilfe des Plate Readers (siehe 2.7) gemessen. Als Kontrollen wurden FSW, Medium, 5%DMSO + FSW (wie in Oberflächenextrakten), Medium + 5%DMSO + FSW, und die Ausgangskultur der Bakterien = unverdünnt + 5%DMSO + FSW verwendet. Für die geplanten Ansiedlungsversuche mit *B. aquimaris* wurden die angeimpften Kulturen 24 Stunden wachsen gelassen und unverdünnt benutzt, während sie für die Wachstumsversuche 1:10 mit FSW verdünnt wurden. Bei *Amphora spec.* wurde die angeimpfte Kultur für die bevorstehenden Wachstumsversuche 48 Stunden wachsen gelassen, für die Ansiedlungsversuche 120 Stunden. Als Kontrollen dienten dieselben wie bei *B. aquimaris*, aber entsprechend mit Diatomeen-Suspension statt mit Bakterien-Suspension.

Um zu schauen, wie lange man die Diatomeen-Suspension färben muss, um ein gutes Messergebnis zu bekommen (ob und wann die Zellen gefärbt wurden und ob sie nach verschieden langer Einwirkzeit unterschiedlich stark fluoreszierten), wurde eine über 120 Stunden gewachsene Diatomeenkultur mit Syto9 gefärbt, im Dunkeln inkubiert, und dann zu verschiedenen Zeitpunkten (10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten) die Fluoreszenz gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen schon nach 10 Minuten ausreichend fluoreszierten, und kein großer Unterschied zwischen den Färbezeiten existierte. In den Bioassays mit den Extrakten wurden die wells daher 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und dann mit Hilfe des Plate Readers gemessen. Bei den Eichreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO zeigte sich bei beiden Versuchsorganismen, dass Konzentrationen > 5% schädlich für diese waren. Deshalb wurden die Extrakte so angelöst, dass der Anteil von DMSO am Gesamtvolumen in den wells höchstens 5% betrug (siehe 2.5 Verarbeitung der Extrakte).

2.8.2 Extrakte:

Nach den Vorversuchen und ihren Ergebnissen konnten dann die Extrakte aus den beiden Versuchen (*F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, *F. serratus* und *F. vesiculosus* aus verschiedenen Tiefen) hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Ansiedlungs- und Wachstumsverhalten der beiden Versuchsorganismen getestet werden. Die Durchführung der Bioassays mit den Versuchsorganismen wird nun im Folgenden dargestellt, zunächst für die Oberflächenextrakte (beide Versuche) und anschließend für die Gesamtextrakte (nur erster Versuch). In allen Bioassays wurden die Extrakte in ihrer natürlichen Konzentration (siehe 2.5 Verarbeitung der Extrakte) verwendet.

2.8.2.1 Oberflächenextrakte

Die Oberflächenextrakte beider Versuche wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Ansiedlungs- und Wachstumsverhalten von *Bacillus aquimaris* und von *Amphora spec.* getestet.

Bacillus aquimaris:

Ansiedlungsversuche

Die über 24 Stunden gewachsenen Bakterienkulturen (siehe 2.6.1) wurden in einem Kolben gut vermengt. Anschließend wurden zunächst die Kontrollen (FSW, Medium, Medium mit Bakterien, Medium mit Bakterien + 5%DMSO + FSW, 5%DMSO + FSW, Extrakte ohne Bakteriensuspension) in die jeweiligen wells (schwarze 96 Multiwell-Platten) einpipettiert, sowie die Oberflächenextrakte der Algen. Dann wurde die *Bacillus aquimaris*-Kultur dazugeben (Gesamtvolumen in den wells: 50µl), die Platten für 90 Minuten in den Inkubator gestellt (28°C) und den Bakterien Zeit zur Ansiedlung gelassen. Danach wurden die Platten vorsichtig auf Papier ausgeklopft und die wells zweimal mit 100µl FSW gespült. Anschließend wurde zu allen wells 25µl Syto9 dazu geben und die Platten für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Plate Readers gemessen.

Wachstumsversuche

Die über 24 Stunden gewachsenen Bakterienkulturen (siehe 2.6.1) wurden in einem Kolben gut vermengt und eine 1:10 Verdünnung mit FSW hergestellt, mit der der Wachstumsversuch durchgeführt wurde. Anschließend wurden zunächst die Kontrollen (FSW, Medium, Medium mit Bakterien, Medium mit Bakterien + 5%DMSO + FSW, 5%DMSO + FSW, Extrakte ohne Bakteriensuspension) in die jeweiligen wells (schwarze 96 Multiwell-Platten) einpipettiert, sowie die Oberflächenextrakte der Algen. Dann wurde die verdünnte *Bacillus aquimaris*-Kultur dazugeben (Gesamtvolumen in den wells: 50µl), sowie 50µl Medium. Dann wurden die Platten für 24 Stunden in den Inkubator gestellt und den Bakterien Zeit zum wachsen gegeben. Nach 24 Stunden wurde zu allen wells 25µl Syto9 dazu geben und die

Platten für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Fluoreszenz mit Hilfe des Plate Readers gemessen.

Amphora spec.:

Ansiedlungsversuche

Die Kontrollen (FSW, Medium, Medium mit Diatomeen, Medium mit Diatomeen + 5%DMSO + FSW, 5%DMSO + FSW, Extrakte ohne Diatomeensuspension) wurden in die jeweiligen wells (schwarze 96-Platten) einpipettiert, sowie die Extrakte und die über 120 Stunden gewachsene Diatomeenkultur (Gesamtvolumen: 50µl). Die Platten wurden dann für 5 Stunden in den Klimaraum ins Licht gestellt und den Diatomeen Zeit zur Ansiedlung gelassen. Dann wurden die Platten vorsichtig auf Papier ausgeklopft und zweimal mit 100µl FSW gespült. Dann wurde zu allen wells 25µl Syto9 dazu geben, die Platten 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Fluoreszenz gemessen.

Wachstumsversuche

Die Kontrollen (FSW, Medium, Medium mit Diatomeen, Medium mit Diatomeen + 5%DMSO + FSW, 5%DMSO + FSW, Extrakte ohne Diatomeensuspension) wurden in die jeweiligen wells (schwarze 96-Platten) einpipettiert, sowie die Extrakte und die für 48 Stunden gewachsene Diatomeenkultur (siehe 2.6.2; Gesamtvolumen pro well: 50µl). Zu den wells wurden je 150µl Medium dazu gegeben und die Platten wurden dann für 72 Stunden in den Klimaraum gestellt und den Diatomeen Zeit zum wachsen gegeben. Nach 72 Stunden wurden zu allen wells 25µl Syto9 dazu gegeben, die Platten 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend die Fluoreszenz gemessen.

2.8.2.2 Gesamtextrakte

Gesamtextrakte wurden nur von den Algen des ersten Versuches (verschiedene Temperaturen) hergestellt. Diese wurden auf die gleiche Weise wie die Oberflächenextrakte getestet (siehe 2.8.2.1), mit einigen Abweichungen, die nun im Folgenden benannt werden. Das Gesamtvolumen in den wells betrug 200µl, davon 10µl Extrakt (in DMSO gelöst). Gespült (Ansiedlungsversuche) wurde mit 200µl FSW, gefärbt mit 50µl Syto9. Ansonsten blieb das Verfahren das Gleiche wie in 2.8.2.1 beschrieben.

2.9 Statistik

Die aus den Bioassays gewonnenen Daten wurden anschließend auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht. Für den Temperaturversuch wurde eine 3-faktorielle

ANOVA (Statistica 8) gefahren. Aufgrund der vielen Behandlungsstufen (5 Temperaturen) und der hohen Anzahl an Replikaten (6 Replikate) ist die ANOVA recht unempfindlich gegenüber der Verletzung der Voraussetzungen der Normalverteilung oder Varianzhomogenität (Underwood, 1990). Dennoch wurden die Daten zunächst hinsichtlich ihrer Normalverteilung (Shapiro- Wilk W Test) und Varianzhomogenität (Levens-Test) getestet. War keine Normalverteilung oder Varianzhomogenität der Daten vorhanden, wurden diese versucht zu transformieren und anschließend erneut auf Normalverteilung und Varianzhomogenität getestet. War einer dieser beiden Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde das p-Niveau auf 0,01 gesenkt, um die Typ I - Fehlerwahrscheinlichkeit zu minimieren (Underwood, 1990; Glasby, 1998). Waren signifikante Unterschiede vorhanden, wurden post-hoc Test's (Tukey-Test) durchgeführt, um zu schauen, wo die Unterschiede vorhanden waren. Für die statistische Überprüfung der Ergebnisse des zweiten Versuches (Algen aus verschiedenen Tiefen), wurde für jede Algenart separat eine 2-faktorielle ANOVA durchgeführt, da *F. vesiculosus* nur in zwei Tiefen (0m, 1m) und *F. serratus* in drei Tiefen (0m, 1m, 2m) vorkam. Nicht normalverteilte Daten oder inhomogene Varianzen wurden transformiert, um die notwendigen Voraussetzungen zu erfüllen. War eine der beiden Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde das p-Niveau auf 0,01 gesenkt (s.o). Waren signifikante Unterschiede vorhanden, wurden post-hoc Test's (s.o) durchgeführt. Zusätzlich wurden bei beiden Versuchen T-Test's durchgeführt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden sollen nun zunächst die Ergebnisse des ersten Versuches (*F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen) und anschließend die Ergebnisse des zweiten Versuches (*F. serratus* und *F. vesiculosus* aus verschiedenen Tiefen) dargestellt werden. In allen Abbildungen sind die Mittelwerte der Messwerte abzüglich der Mittelwerte der Kontrollen, +/- 95% Konfidenzintervall (CI) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollwells ohne Extrakten und solchen mit Extrakten sind mit * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturen/Tiefen mit kleinen Buchstaben. Unterschiede zwischen unbelebten Oberflächen aus Aquarien mit unbefressenen Algen und solchen mit befreunden Algen werden nur im Text erläutert, ebenso Unterschiede zwischen unbefressenen und befreunden Algen.

3.1 Erster Versuch (verschiedene Temperaturen)

Beim ersten Versuch wurden *F. vesiculosus* Individuen für zwei Wochen bei verschiedenen Temperaturen gehältert. Von den belebten Oberflächen, den Algen, wurden sowohl Oberflächen-, als auch Gesamtextrakte (siehe 2.4) hergestellt. Die Extrakte wurden dann in ihrer natürlichen Konzentration (siehe 2.5) in Bioassays (siehe 2.8) auf ihre Wirkung hinsichtlich der Ansiedlung und dem Wachstum der beiden Versuchsorganismen getestet. Im Folgenden sind die Ergebnisse des ersten Versuches dargestellt.

3.1.1 Unbelebte Oberflächen (Plättchen):

Wie man in Abb. 5 sehen kann, wurde die Lichtdurchlässigkeit auf den unbelebten Oberflächen durch den Aufwuchs innerhalb von 13 Tagen um bis zu 10% vermindert. Während die Transmission bei den niedrigeren Temperaturen (8°C, 12°C) sich nicht erheblich von denen der Kontrollen zu unterscheiden scheint, so ist dieser Effekt bei den höheren Temperaturen doch sehr deutlich wenn auch mit großen Fehlerbalken behaftet. Somit scheint die Temperatur einen Einfluss auf den Besiedlungsdruck zu haben und somit auf die Menge an Aufwuchs.

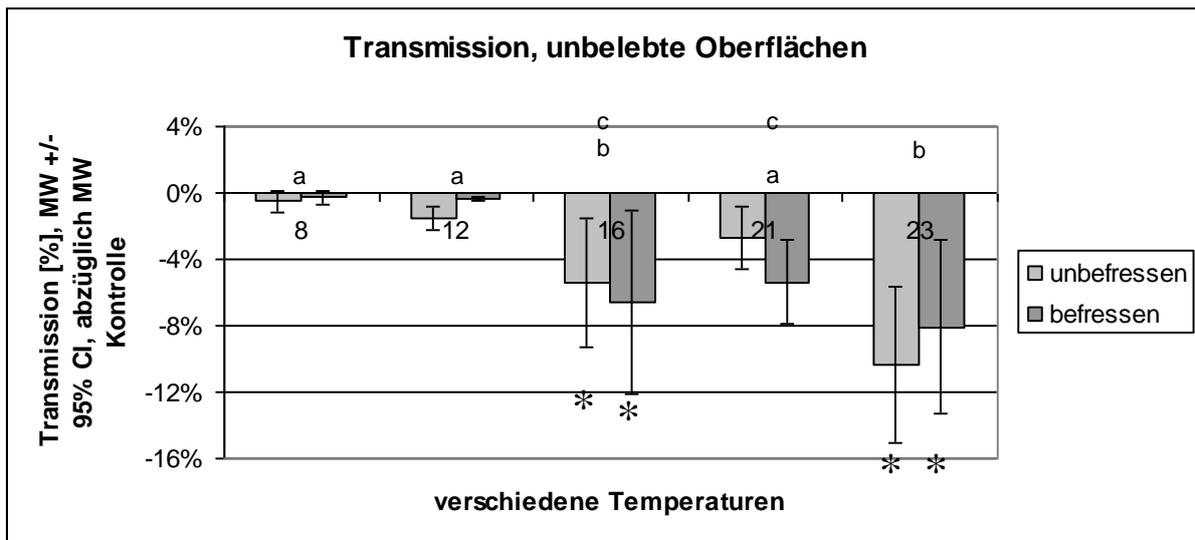


Abb. 5: Verminderung der Lichtdurchlässigkeit durch Aufwuchs auf den unbelebten Oberflächen, die in den Aquarien der unbefressenen und befressenen Algen hing (1- Absorption = Transmission; MW Transmission +/- 95% CI, abzüglich MW Kontrolle in [%]).

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass es einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Kontrollen und Plättchen mit Aufwuchs gab. Diese waren bei 16°C und 23°C signifikant, in der Abbildung mit * gekennzeichnet. Auch war ein signifikanter Effekt der Temperatur vorhanden ($p < 0,001$). Die Plättchen bei 23°C unterschieden sich von allen außer denen bei 16°C, während die bei 16°C sich nicht von denen bei 21°C unterschieden, wohl aber von denen bei 8°C und 12°C. Die Plättchen bei den beiden niedrigen Temperaturen unterschieden sich nicht von denen bei 21°C und auch nicht von den Kontrollen. Somit hatte die Temperatur einen signifikanten Effekt auf die Menge an Aufwuchs (Temp.* V_U, $p < 0,001$).

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz (hauptsächlich Diatomeen) der Abstriche der unbelebten Oberflächen zeigte, dass bei 8°C sehr wenig Chlorophyll, also Algen vorhanden waren, ebenso bei 12°C (siehe Abb.6). Wesentlich mehr Chlorophyll als in den Kontrollen scheint auf den unbelebten Oberflächen bei 16°C und 23°C vorhanden gewesen zu sein.

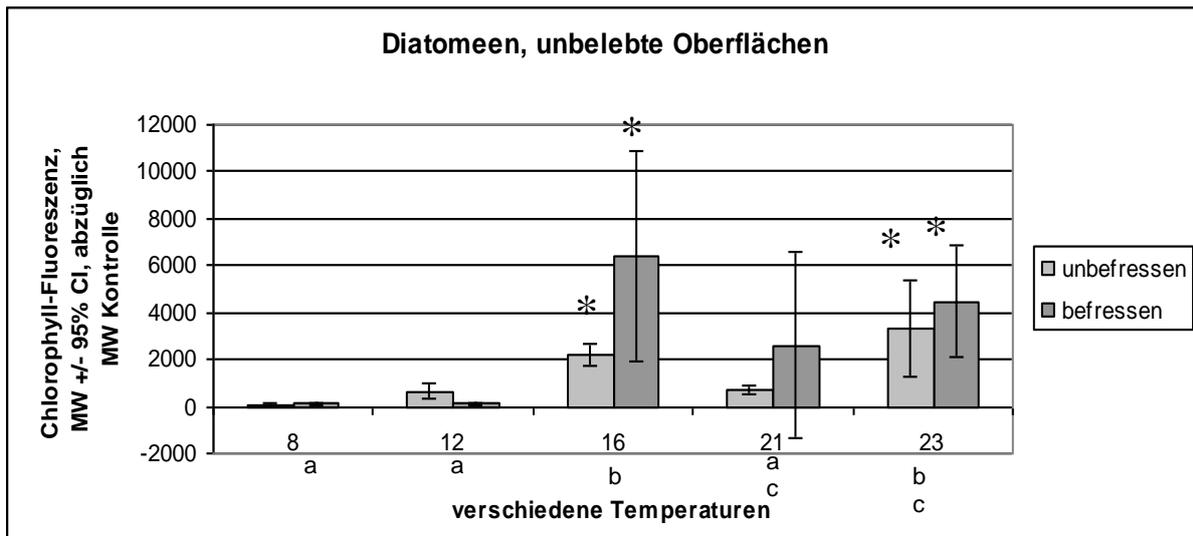


Abb. 6: Chlorophyll-Fluoreszenz, hauptsächlich Diatomeen, die sich in den Abstrichen von den unbelebten Oberflächen in den Aquarien der unbefressenen und befressenen Algen befanden.

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse (siehe 2.9) zeigte, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen unbelebten Oberflächen und Kontrollen vorhanden war. Die Abstriche der Plättchen bei 16°C und die bei 23°C enthielten signifikant mehr Chlorophyll als die Kontrollen. Auch gab es Unterschiede zwischen den Temperaturen ($p < 0,001$). Somit hatte die Temperatur einen Einfluss auf die Menge an Aufwuchs (hauptsächlich Diatomeen): die Abstriche der Plättchen von 23°C und 16°C enthielten signifikant mehr Chlorophyll als die Kontrollen und die Abstriche der Plättchen bei den anderen Temperaturen. Es ist also der gleiche Trend wie in Abb.5 zu erkennen, somit wurde die Transmission vor allem durch den Aufwuchs an Diatomeen reduziert.

Um neben den Algen, größtenteils Diatomeen, auch die vorhandenen Bakterien zu erfassen, die sich auf den unbelebten Oberflächen befanden, wurde mit dem DNA-Farbstoff Syto9 gefärbt (siehe 2.3.1) und anschließend die Fluoreszenz aller gefärbten RNA gemessen, also von vorhandenen Diatomeen und Bakterien. Wie man in Abb. 7 sehen kann, waren in den Abstrichen der Plättchen, mit Ausnahme von 8°C unbefressen, mit zunehmender Temperatur mehr Diatomeen und Bakterien vorhanden als in den Kontrollen. Auch sieht man, dass zumindestens bei 21°C und 23°C auf den Plättchen in den Aquarien der befressenen Algen mehr Aufwuchs vorhanden war als auf den Plättchen, die in den Aquarien der unbefressenen Algen hingen. Somit scheint zum einen die Temperatur einen Einfluss auf den Besiedlungsdruck (mit zunehmender Temperatur nimmt er zu) zu haben. Zum anderen scheint es auch einen Unterschied zwischen den Plättchen aus befressenen und solchen aus Aquarien mit unbefressenen Algen zu geben.

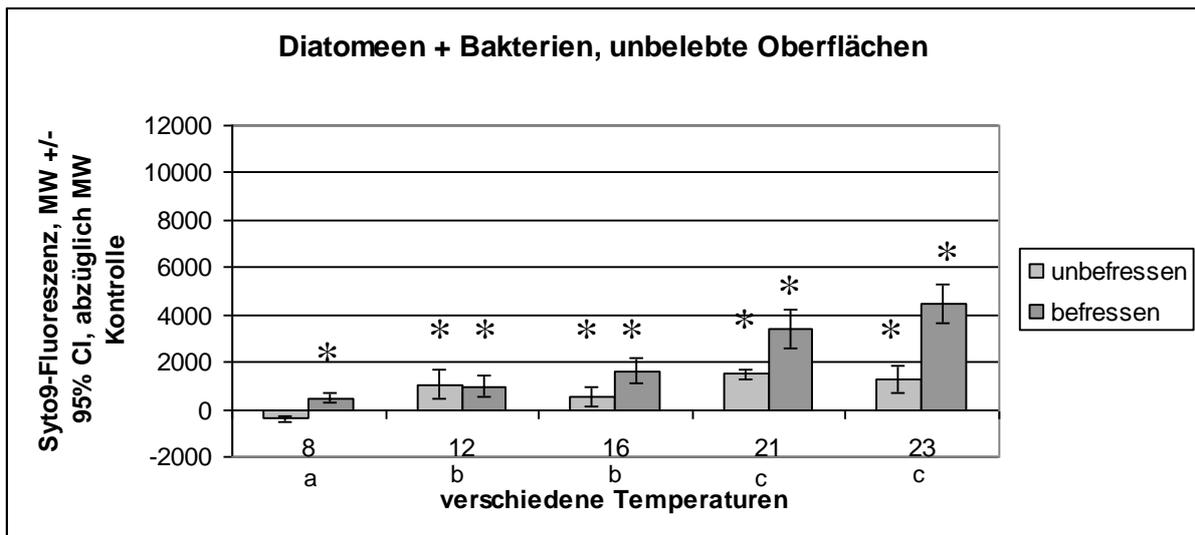


Abb. 7: Diatomeen und Bakterien, Syto9-Fluoreszenz der Abstriche, die sich in den Aquarien der unbefressenen und befressenen Algen befanden.

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse zeigte, dass es signifikante Unterschiede zwischen unbelebten Oberflächen und Kontrollen ($p < 0,001$), zwischen den Temperaturen ($p < 0,001$) und zwischen den Plättchen, die in den Aquarien mit unbefressenen Algen und solchen die in Aquarien der befressenen Algen hingen ($p < 0,001$), gab. Die Plättchen bei 8°C in den Aquarien der unbefressenen Algen enthielten nicht mehr Diatomeen und Bakterien als die Kontrollen und unterschieden sich somit von allen anderen unbelebten Oberflächen. Ebenso war auf den Plättchen bei 21°C ($p = 0,0163$) und 23°C ($p = 0,0076$), die in den Aquarien der befressenen Algen hingen, deutlich mehr Diatomeen und Bakterien vorhanden im Vergleich zu ihren Gegenstücken in den Aquarien der unbefressenen Algen (nicht in Abb.7 dargestellt), als auch im Vergleich zu allen anderen unbelebten Oberflächen. Es unterschieden sich also die Abstriche der Plättchen bei 21°C und 23°C von denen der anderen Temperaturen, ebenso hatten die Abstriche der Plättchen bei 12°C und 16°C Gemeinsamkeiten, unterschieden sich aber von denen bei 8°C (siehe Abb.7).

3.1.2 Oberflächenextrakte:

B. aquimaris Ansiedlung:

Die Oberflächenextrakte von *F. vesiculosus* scheinen die Ansiedlung von *B. aquimaris* effektiv zu inhibieren. Nur bei den Extrakten der unbefressenen Algen bei 8°C ist dieser Effekt nicht eindeutig zu erkennen, da der Fehlerbalken sehr groß ist (siehe Abb.8). Man kann keinen eindeutigen Trend erkennen, ob die Algenextrakte der unbefressenen oder der befressenen Individuen stärker inhibitorisch auf die

Ansiedlung von *B. aquimaris* wirkten. Ebenso ist kein eindeutiger Effekt der Temperatur auf die Stärke der Verteidigung zu erkennen.

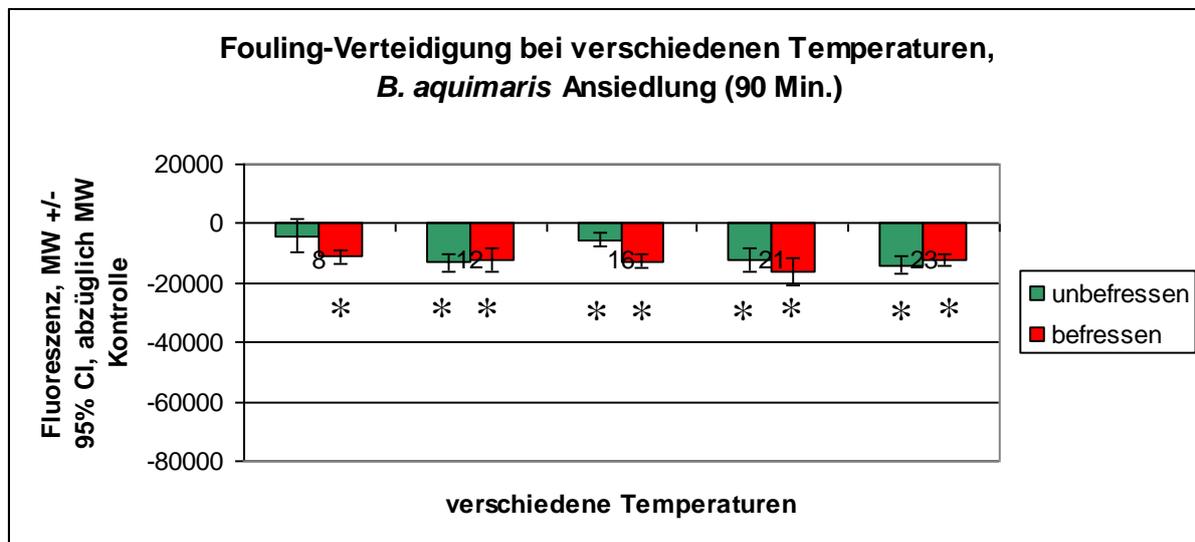


Abb. 8: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Oberflächenextrakte, getestet gegen die Ansiedlung (90 Min.) von *B. aquimaris*.

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass es einen signifikanten ($p < 0,001$) Unterschied zwischen Kontrollwells ohne Extrakten und solchen mit Extrakte gab. T-Test's zeigten, dass nur bei den Extrakten der unbefressenen Algen bei 8°C kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1027$) zwischen Kontrollwells und solchen mit Algenextrakte vorhanden war. Der Effekt der Temperatur ($p = 0,045$) und von befressen und unbefressen ($p = 0,015$) verschwand aufgrund der Absenkung des p-Niveaus auf 0,01 (keine Normalverteilung der Daten erreicht). Also inhibierten alle Oberflächenextrakte, mit Ausnahme der von 8°C unbefressen, die Ansiedlung von *B. aquimaris* (siehe Abb.8).

***B. aquimaris* Wachstum:**

Das Wachstum von *B. aquimaris* wurde durch die Oberflächenextrakte von *F. vesiculosus*, ebenso wie das Festsetzen, deutlich inhibiert. Es ist kein Unterschied zwischen den Extrakten der unbefressenen und befressenen Algen zu erkennen. Die Stärke der Verteidigung scheint mit den verschiedenen Temperaturen etwas zu variieren, es ist aber kein eindeutiger Trend erkennbar (siehe Abb.9).

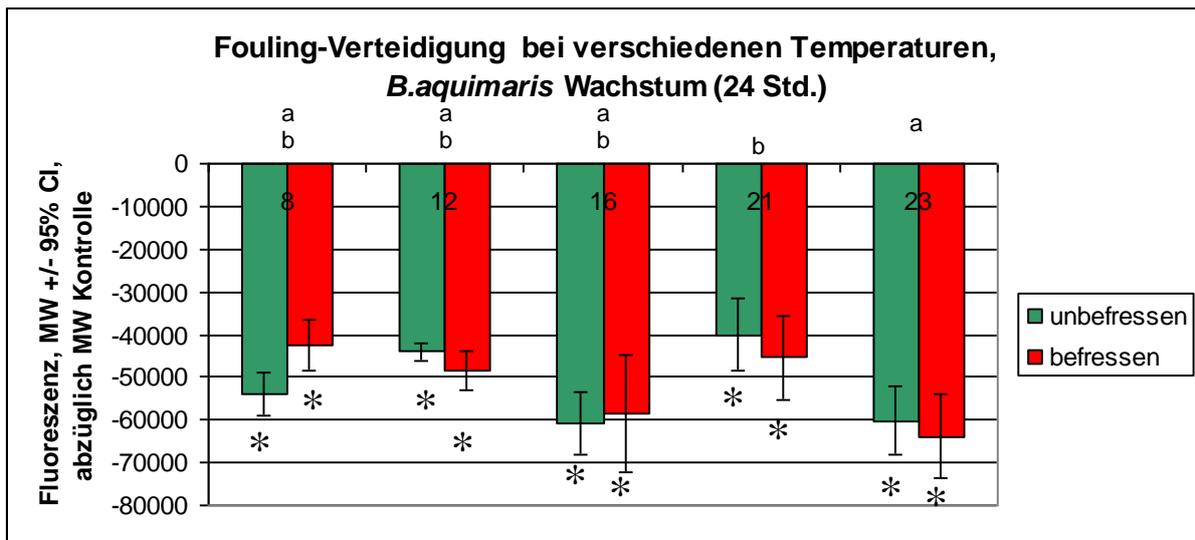


Abb. 9: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Oberflächenextrakte, getestet gegen das Wachstum (24 Std.) von *B. aquimaris*.

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse zeigte, dass alle Oberflächenextrakte signifikant ($p < 0,001$) inhibierend auf das Wachstum von *B. aquimaris* wirkten. Auch hatte die Temperatur einen signifikanten Effekt ($p = 0,008$) auf die Stärke der Verteidigung: die Algen bei 21°C waren nicht so stark verteidigt wie die bei 23°C (siehe Abb.9).

***Amphora spec.* Ansiedlung:**

In Abb. 10 kann man erkennen, dass alle Algenextrakte inhibierend auf die Ansiedlung von *Amphora spec.* wirkten. Die Temperatur scheint keinen bedeutenden Einfluss auf die Stärke der Verteidigung zu haben.

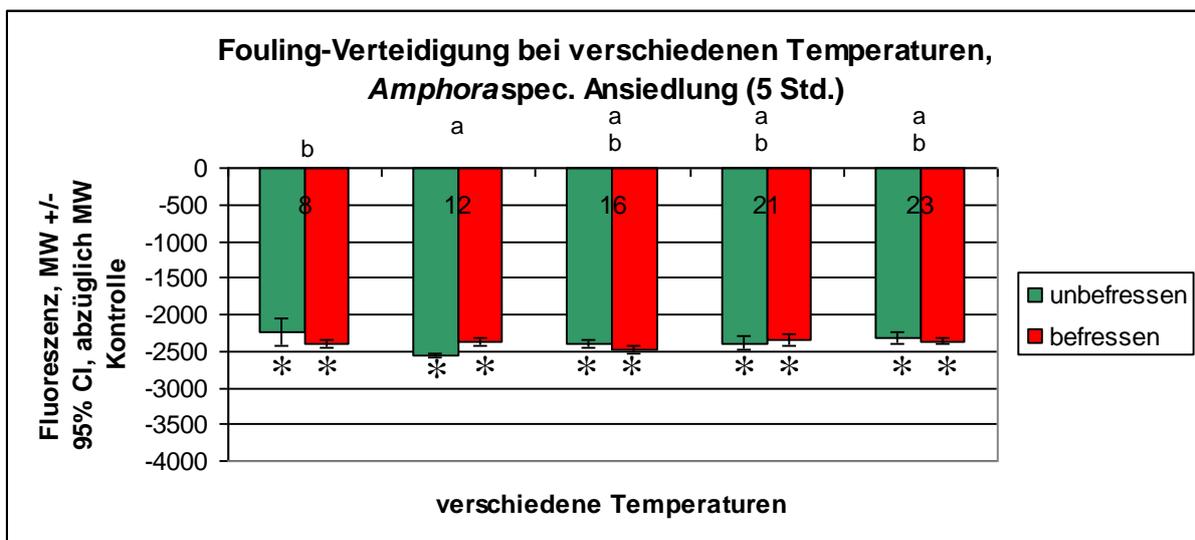


Abb. 10: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Oberflächenextrakte, getestet gegen die Ansiedlung (5 Std.) von *Amphora spec.*..

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass alle Oberflächenextrakte, sowohl die der unbefressenen Algen als auch die der befreunden Algen, die Ansiedlung von *Amphora spec.* signifikant ($p < 0,001$) inhibierten. Auch hatte die Temperatur einen signifikanten Effekt ($p = 0,005$) auf die Stärke der Verteidigung: die Algenextrakte der Algen bei 8°C waren weniger stark verteidigt als die bei 12°C (siehe Abb.10).

Amphora spec. Wachstum:

Das Wachstum von *Amphora spec.* scheint, wenn überhaupt, nur bei 8°C, 16°C und 23°C inhibiert zu werden, wobei es keinen Unterschied zwischen den Algenextrakten der befreunden und unbefressenen Algen zu geben scheint.

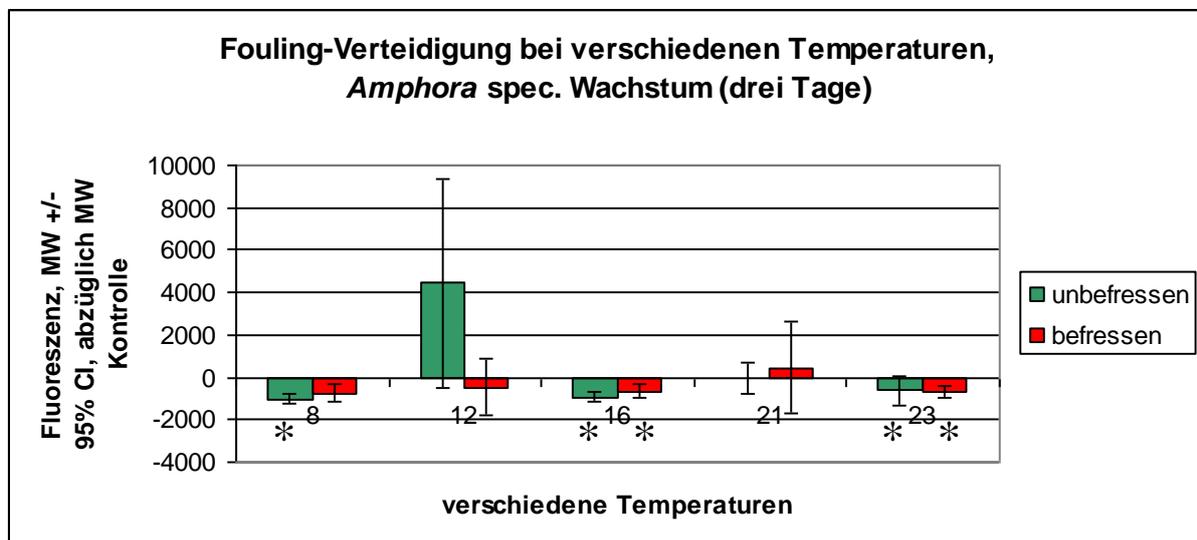


Abb. 11: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Oberflächenextrakte, getestet gegen das Wachstum (drei Tage) von *Amphora spec.*.

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollwells und solchen mit Algenextrakten, wohl aber dass sich 8°C befreunden, 21°C befreunden und 12°C unbefressen sich von den anderen unterschieden ($p = 0,002$). Die T-Test's zeigten auch, dass nur bei 21°C, 12°C und 8°C befreunden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen Kontrollen und Extrakten vorhanden waren. Somit kann man sagen, dass wenn überhaupt nur die Oberflächenextrakte der Algen bei 8°C unbefressen, sowie bei 16°C und 23°C inhibierend auf das Wachstum von *Amphora spec.* wirkten. Es ist also kein eindeutiger Trend zu erkennen.

3.1.3 Gesamtextrakte:

B. aquimaris Ansiedlung:

Die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* scheinen das Festsetzen bzw. die Ansiedlung von *B. aquimaris* deutlich inhibiert zu haben. Dabei scheint es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Temperaturen sowie zwischen unbefressenen und befreßenen Algen zu geben (siehe Abb.12).

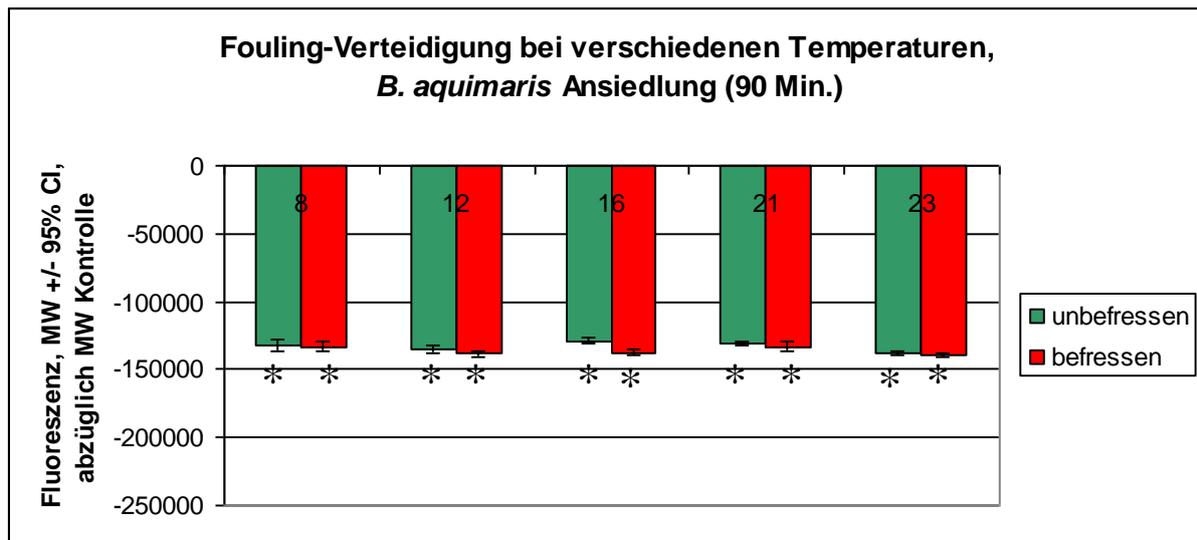


Abb. 12: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Gesamtextrakte, getestet gegen die Ansiedlung (90 Min.) von *B. aquimaris*.

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Kontrollwells und solchen mit Algenextrakte vorhanden war. Die T-Test's zeigten zudem das alle Extrakte, sowohl befreßenen als auch unbefressenen Algen, gleichermaßen inhibitorisch auf die Ansiedlung von *B. aquimaris* wirkten. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturen und den Extrakte der befreßenen und unbefressenen Algen. Vergleicht man dieses mit der Wirkung der Oberflächenextrakte (siehe Abb.8), kann man sagen, dass die Gesamtextrakte die Ansiedlung von *B. aquimaris* stärker inhibierten als die Oberflächenextrakte.

B. aquimaris Wachstum:

Auch das Wachstum von *B. aquimaris* scheint durch die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* bei allen Temperaturen inhibiert worden zu sein, wobei es keinen Unterschied zwischen den Temperaturen oder den Extrakte der befreßenen und unbefressenen Algen zu geben scheint (siehe Abb.13).

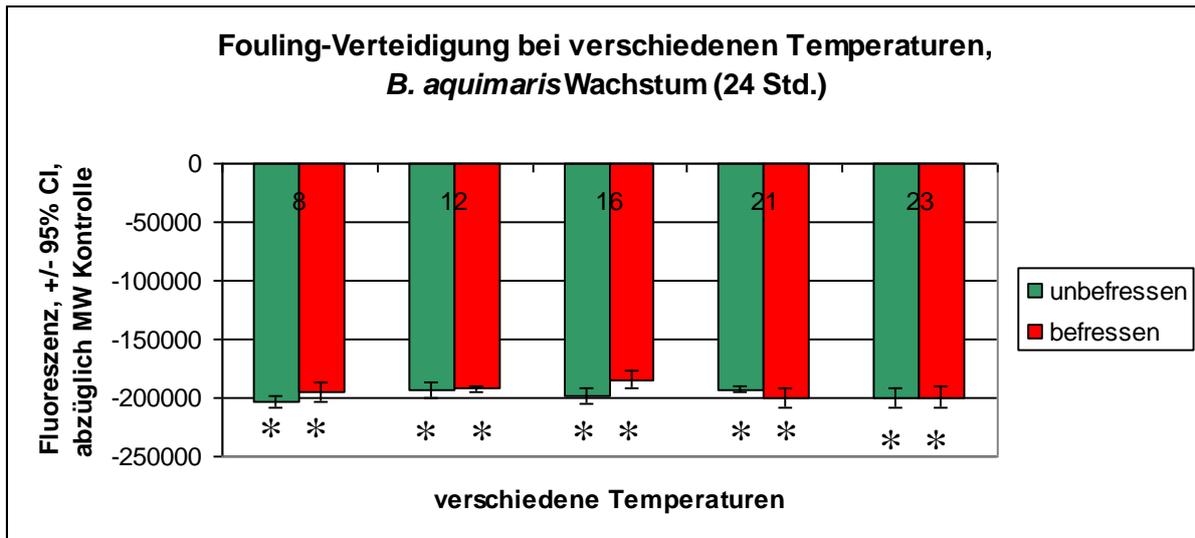


Abb. 13: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Gesamtextrakte, getestet gegen das Wachstum (24 Std.) von *B. aquimaris*.

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass der wachstumsinhibierende Effekt signifikant ($p < 0,001$) war. T-Test's zeigten, dass alle Extrakte gleichermaßen inhibitorisch auf das Wachstum von *B. aquimaris* wirkten. Es war kein Unterschied zwischen befressenen und unbefressenen Algenextrakten vorhanden, ebenso waren keine Unterschiede zwischen den Temperaturen vorhanden. Im Vergleich zur Wirkung der Oberflächenextrakte auf das Wachstum von *B. aquimaris* (siehe Abb.9) kann man sagen, dass die Gesamtextrakte stärker inhibitorisch wirkten als die Oberflächenextrakte.

Amphora spec. Festsetzen:

Die Ansiedlung der Diatomee *Amphora spec.* scheint auch effektiv durch die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* inhibiert zu werden. Bei den niedrigen Temperaturen (8°C, 12°C) scheinen die Extrakte der unbefressenen Algen stärker inhibitorisch gewirkt zu haben als die der befressenen Algen. Bei den höheren Temperaturen war dies anders herum und die Algenextrakte der befressenen Algen scheinen die Ansiedlung von *Amphora spec.* stärker inhibiert zu haben (siehe Abb.14). Es ist also kein eindeutiger Trend zwischen den Extrakten der unbefressenen und befressenen Algen zu erkennen, auch nicht zwischen den verschiedenen Temperaturen.

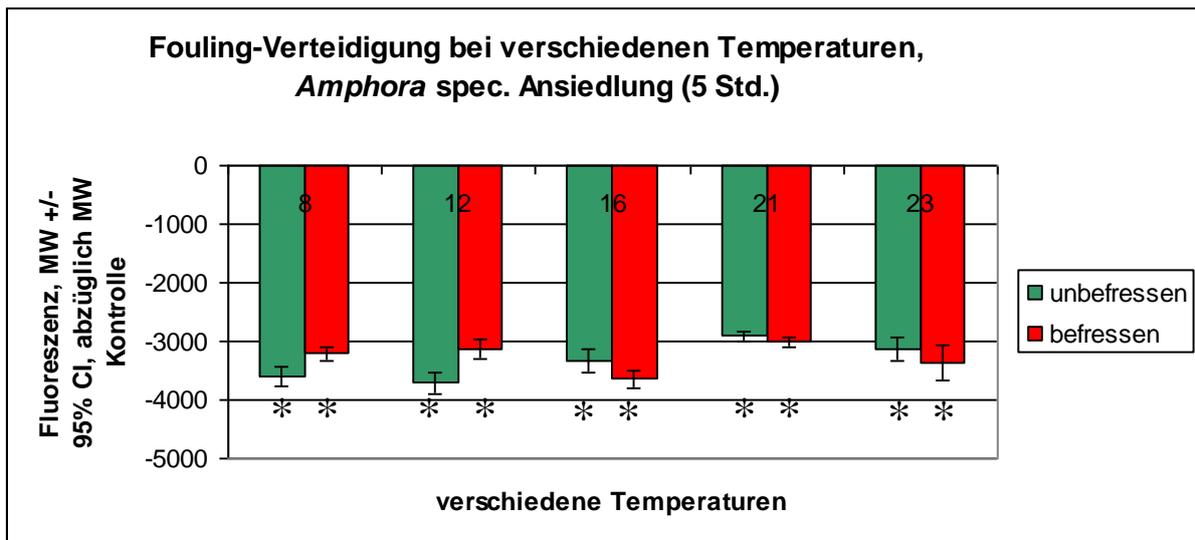


Abb. 14: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Gesamtextrakte, getestet gegen die Ansiedlung (5 Std.) von *Amphora spec.*.

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse bestätigte den ersten Eindruck, dass die Gesamtextrakte die Ansiedlung von *Amphora spec.* signifikant ($p < 0,001$) inhibierten. T-Tests zeigten dass alle Gesamtextrakte, sowohl der unbefressenen als auch der befressenen Algen, diesen Effekt hatten. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Extrakte der befressenen und unbefressenen Algen vorhanden, ebenso hatte die Temperatur keinen Effekt auf die Verteidigung. Die Gesamtextrakte wirkten stärker inhibierend auf die Ansiedlung von *Amphora spec.* als die Oberflächenextrakte (siehe Abb.10).

***Amphora spec.* Wachstum:**

Wie man in Abb. 15 sehen kann, scheinen die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* eher förderlich für das Wachstum von *Amphora spec.* gewesen zu sein, abgesehen von den Extrakten bei 23°C, wo dieser Effekt nicht deutlich erkennbar ist.

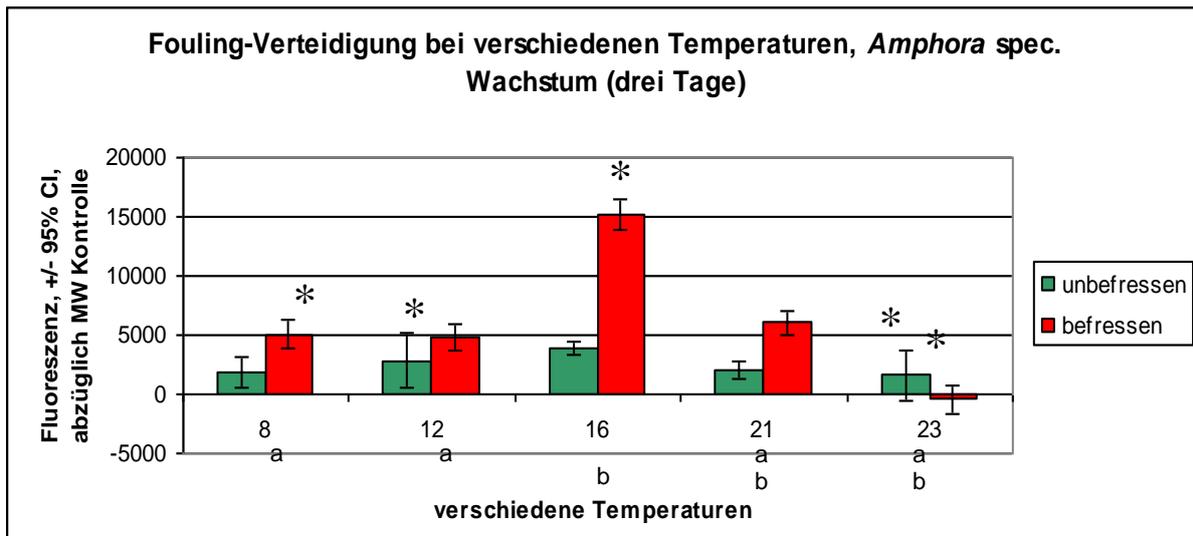


Abb. 15: Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* bei verschiedenen Temperaturen, Gesamtextrakte, getestet gegen das Wachstum (drei Tage) von *Amphora spec.*.

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass es signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen Kontrollwells ohne Extrakten und solchen mit Extrakten gab. T-Test's zeigten, dass die Unterschiede bei 8°C befressen ($p = 0,0142$), 12°C unbefressen ($p = 0,0422$), 16°C befressen ($p = 0,009$), sowie bei 23°C unbefressen ($p = 0,0161$) und befressen ($p = 0,0018$) signifikant waren. Somit waren die Extrakte signifikant förderlich für das Wachstum von *Amphora spec.*, wobei bei 23°C befressen nicht klar ist ob der Unterschied darauf beruht das ein förderlicher Effekt auf das Wachstum vorhanden war (siehe Abb.15) oder ein inhibierender. Es war auch ein Effekt der Temperatur vorhanden: die Extrakte von 8°C und 12°C unterschieden sich von denen bei 16°C. Die statistische Überprüfung der Ergebnisse bezüglich der Wirkung der Extrakte auf das Wachstum von *Amphora spec.* waren somit eher verwirrend. Man kann aber sagen, dass die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* das Wachstum der Diatomeen nicht inhibierten.

Während die Oberflächenextrakte das Wachstum von *Amphora spec.* (siehe Abb.11) tendenziell eher inhibierten, zeigten die Gesamtextrakte eine förderliche Wirkung auf das Wachstum von *Amphora spec.*

3.2 Zweiter Versuch (verschiedene Tiefen)

Beim zweiten Versuch (Algen aus verschiedenen Tiefen) wurden nur Oberflächenextrakte der Algen (*F. serratus* aus 0m, 1m, 2m; *F. vesiculosus* aus 0m, 1m, siehe 2.4.1) hergestellt und diese in ihrer natürlichen Konzentration (siehe 2.5 Verarbeitung der Extrakte) auf die gleiche Weise getestet wie die Algenextrakte des ersten Versuches (siehe 2.8 Bioassays). Da *F. serratus* in drei Tiefen und *F.*

vesiculosus in nur zwei Tiefen vorkam, wurde die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse für jede Alge separat durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse des zweiten Versuches dargestellt.

B. aquimaris Ansiedlung:

F. vesiculosus scheint in beiden vorkommenden Tiefen gut gegen die Ansiedlung von *B. aquimaris* verteidigt gewesen zu sein, während dies für *F. serratus* nur in 0 Metern so zu sein scheint. Bei *F. serratus* scheint die Verteidigung mit zunehmender Tiefe abzunehmen, während sie bei *F. vesiculosus* annähernd gleich zu bleiben scheint (siehe Abb.16).

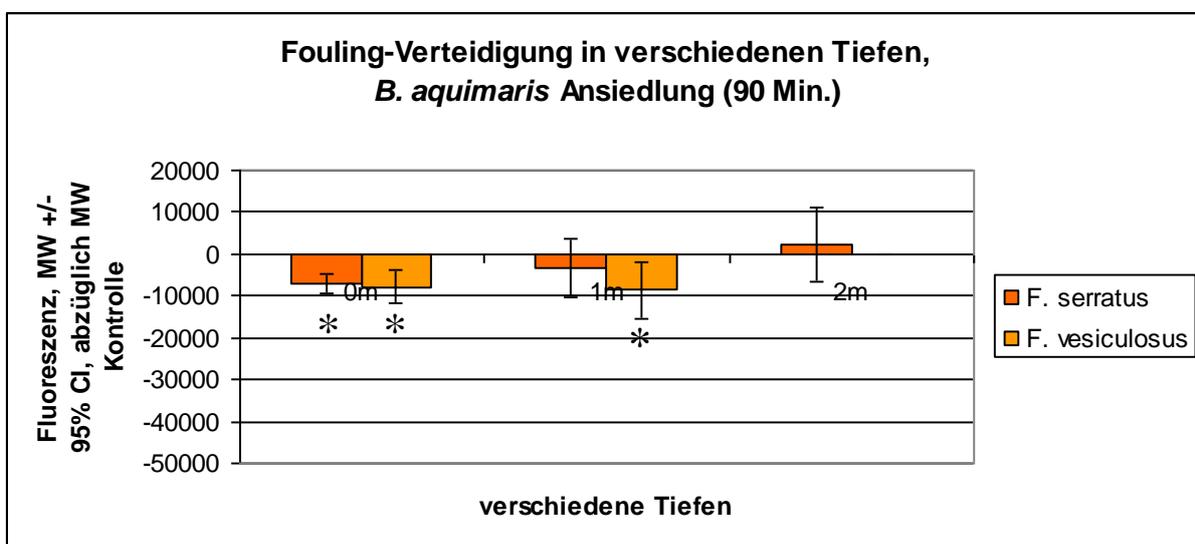


Abb. 16: Fouling-Verteidigung von *F. serratus* und *F. vesiculosus* in verschiedenen Tiefen, Oberflächenextrakte, getestet gegen die Ansiedlung (90 Min.) von *B. aquimaris*.

Die ANOVA (siehe 2.9) zeigte für *F. serratus* keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zwischen Kontrollwells ohne Extrakten und solchen mit Algenextrakten. Bei *F. vesiculosus* war dieser Unterschied hingegen signifikant ($p < 0,001$). T-Test's bestätigten den signifikanten Unterschied zwischen Kontrollwells und solchen mit Algenextrakten für *F. vesiculosus* in beiden Tiefen, zeigten aber auch einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0028$) zwischen Kontrollwells und solchen mit Extrakten von *F. serratus* in 0 Meter Tiefe. Somit kann man sagen, dass *F. vesiculosus* in beiden Tiefen gegen die Ansiedlung von *Bacillus aquimaris* verteidigt war, während man dies für *F. serratus* wenn nur für 0 Meter Tiefe behaupten kann. Die Tiefe hatte bei beiden Algenarten keinen Effekt auf die Verteidigung.

B. aquimaris Wachstum:

Das Wachstum von *B. aquimaris* wurde durch die Oberflächenextrakte beider Algenarten inhibiert. Bei *F. serratus* scheint die Verteidigung mit zunehmender Tiefe

abzunehmen, bzw. in zwei Meter Tiefe nicht mehr vorhanden zu sein. Dagegen scheint *F. vesiculosus* in beiden vorkommenden Tiefen gut verteidigt gewesen zu sein (siehe Abb.17).

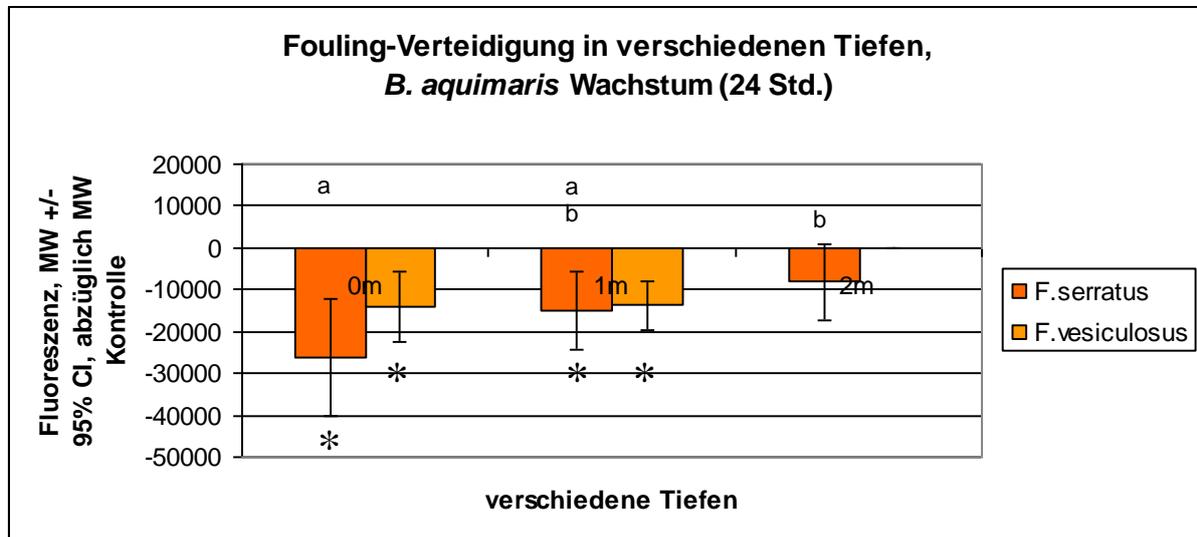


Abb. 17: Fouling-Verteidigung von *F. serratus* und *F. vesiculosus* in verschiedenen Tiefen, Oberflächenextrakte, getestet gegen das Wachstum (24 Std.) von *B. aquimaris*.

Die statistische Überprüfung (siehe 2.9) der Ergebnisse zeigte, dass *F. vesiculosus* das Wachstum von *B. aquimaris* signifikant ($p < 0,001$) inhibiert. Die Tiefe hatte bei *F. vesiculosus* keinen Effekt auf die Verteidigung. *F. serratus* war ebenfalls signifikant verteidigt ($p < 0,001$), aber nur in 0 und 1 Meter Tiefe, hier hatte also die Tiefe einen Effekt auf die Verteidigung ($p = 0,009$). Beide Algenarten waren also in den ersten beiden Tiefen gegen das Wachstum von *B. aquimaris* verteidigt bzw. inhibierten es, nur *F. serratus* aus zwei Metern Tiefe nicht. Bei *F. serratus* hatte die Tiefe also einen Effekt auf die Stärke der Verteidigung (nimmt mit zunehmender Tiefe ab), bei *F. vesiculosus* nicht.

Amphora spec. Ansiedlung:

Gegen das Festsetzen von *Amphora spec.* scheinen beide Algenarten in allen Tiefen gut verteidigt gewesen zu sein, wenn man über den großen Fehlerbalken bei *F. serratus* in 1 Meter Tiefe hinweg sieht, wobei kein Unterschied zwischen den verschiedenen Tiefen vorhanden zu sein scheint (siehe Abb.18).

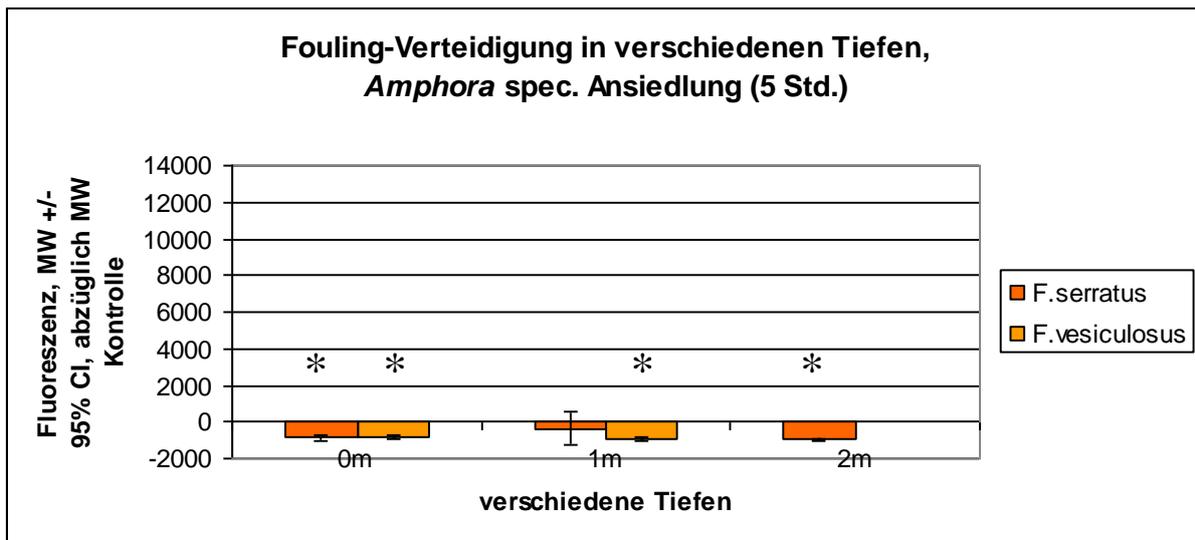


Abb. 18: Fouling-Verteidigung von *F. serratus* und *F. vesiculosus* in verschiedenen Tiefen, Oberflächenextrakte, getestet gegen die Ansiedlung (5 Std.) von *Amphora spec.*.

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse (siehe 2.9) bestätigte, dass beide Algenarten signifikant ($p < 0,001$) das Festsetzen von *Amphora spec.* inhibierten. Die T-Test's zeigten aber auch, dass für *F. serratus* in 1 Meter Tiefe kein signifikanter Unterschied ($p = 0,4964$) zwischen Kontrollwells und solchen mit Algenextrakten vorhanden war, vermutlich aufgrund des großen Fehlerbalkens. Bei beiden Algenarten waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiefen vorhanden, somit hatte diese keinen Effekt auf die Verteidigung.

Amphora Wachstum:

Bei der Überprüfung welche Wirkung die Algenextrakte auf das Wachstum von *Amphora spec.* hatten, zeigte sich das die Extrakte beider Algenarten eher förderlich für das Wachstum der Diatomeen waren. Während dieser Trend für *F. serratus* eindeutig war und mit zunehmender Tiefe zuzunehmen schien, kann man dies für *F. vesiculosus* nicht behaupten (siehe Abb.19). Hier scheinen wenn nur die Extrakte aus 0 Meter Tiefe einen wachstumsfördernden Effekt gehabt zu haben, während die Extrakte der Individuen aus 1 Meter Tiefe keinen Effekt auf das Wachstum von *Amphora spec.* hatten.

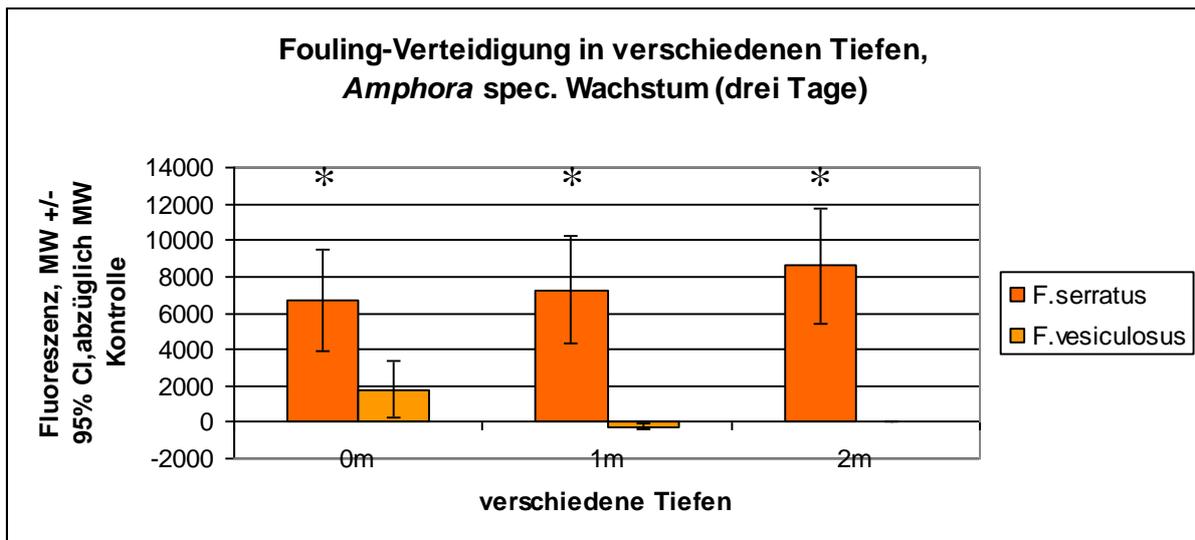


Abb. 19: Fouling-Verteidigung von *F. serratus* und *F. vesiculosus* in verschiedenen Tiefen, Oberflächenextrakte, getestet gegen das Wachstum (drei Tage) von *Amphora spec.*.

Bei *F. serratus* war ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Kontrollwells ohne Extrakten und solchen mit Extrakten der Algen vorhanden (siehe Abb.19). Die Algenextrakte waren somit förderlich für das Wachstum von *Amphora spec.*; die Tiefe hatte keinen Effekt. Bei *F. vesiculosus* war kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen Kontrollwells und solchen mit Algenextrakte vorhanden. Der Effekt der Tiefe ($p = 0,037$) verschwand aufgrund (keine Normalverteilung gegeben) der Absenkung des p-Niveaus auf 0,01 (siehe 2.9). Die Extrakte von *F. vesiculosus* hatten also keinen Effekt auf das Wachstum von *Amphora spec.*, während die Extrakte von *F. serratus* das Wachstum von *Amphora spec.* eindeutig verstärkten.

4. Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse beider Versuche zusammengefasst und diskutiert, sowie aufgetretene Probleme erläutert werden.

4.1 Effekt der Tiefe auf die Fouling-Verteidigung

Im zweiten Versuch wurden Oberflächenextrakte von *F. serratus* und *F. vesiculosus* aus verschiedenen Tiefen hergestellt. Diese wurden dann in ihrer natürlichen Konzentration hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Ansiedlung und das Wachstum der beiden Versuchsorganismen getestet. Für *F. vesiculosus* ergibt sich ein recht eindeutiges Bild, nämlich dass dieser in beiden vorkommenden Tiefen (0m, 1m) gut gegen die Ansiedlung beider Versuchsorganismen verteidigt war. Das Wachstum dagegen wurde nur bei *B. aquimaris* inhibiert, nicht aber bei *Amphora spec.*. Die Tiefe hatte keinen Effekt auf die Fouling-Verteidigung bei *F. vesiculosus*. Für *F. serratus* ergibt sich ein etwas anderes Bild: nur die Oberflächenextrakte der Algen aus 0 Metern Tiefe inhibierten wenn überhaupt (siehe Abb.16) die Ansiedlung von *B. aquimaris*. Das Wachstum von *B. aquimaris* wurde in 2 Metern Tiefe nicht inhibiert. Während die Ansiedlung von *Amphora spec.* in Anwesenheit der Extraktbestandteile signifikant inhibiert wurde, mal abgesehen von dem großen Fehlerbalken in 1 Meter Tiefe, wurde das Wachstum der Diatomee durch die Präsenz der Extrakte dagegen signifikant verstärkt (siehe Abb.19) im Vergleich zu den Kontrollen ohne Extrakten. Leider war kein direkter statistischer Vergleich der Fouling-Verteidigung beider Algen miteinander möglich, da *F. vesiculosus* nur in zwei und *F. serratus* in drei Tiefen vorhanden war.

Man weiß, dass der Fouling- Druck mit Lokalität, der Jahreszeit und Wassertiefe variiert (Wahl, 1989). Während der bakterielle Aufwuchs sich mit zunehmender Tiefe nicht verändern oder abnehmen wird, kann man mit zunehmender Tiefe eine Abnahme des Diatomeen-Bewuchses aufgrund der abnehmenden Lichtintensität erwarten. Aufgrund dessen sollten Algen in flacheren Wassertiefen besser gegen Diatomeen verteidigt sein als tiefer wachsende Algen, während man davon ausgehen kann, dass die Stärke der Verteidigung der Algen gegen bakteriellen Aufwuchs sich zwischen verschiedenen Tiefen nicht unterscheidet.

Diese Erwartungen wurden durch die Ergebnisse nicht bestätigt. Bei *F. serratus* war ein Effekt der Tiefe bezüglich der bakteriellen Besiedlung von *B. aquimaris* vorhanden, aber nicht auf die der Diatomeen. Bei *F. vesiculosus* war kein Effekt der Tiefe auf die Fouling-Verteidigung vorhanden. Dieses widerspricht also den oben genannten Erwartungen und könnte somit auch ein Grund für den starken Rückgang

der Algen aus der litoralen Makroalgen-Gemeinschaft sein. Die Tiefenverbreitung von *F. vesiculosus* wird vor allem durch die Lichtverfügbarkeit bestimmt (Kautsky et al., 1986). Die Biomasse von *F. vesiculosus* ist in den letzten drei Jahrzehnten um bis zu 95% der Biomasse zurückgegangen (Schramm & Nienhuis, 1996). Es ist bekannt, dass dieser starke Rückgang der *F. vesiculosus*- Populationen auf die zunehmende Eutrophierung (Kautsky et al., 1986, Koie & Kristiansen, 2001; Vogt & Schramm, 1991) zurückzuführen ist und der dadurch bedingten Abnahme der Transparenz der Wassersäule (Kautsky et al., 1986). Durch Eutrophierungsprozesse wird vor allem das Wachstum schnell wachsender Mikroalgen (z.B. *Amphora spec.*) und Epibionten gefördert, die zu einer schnellen Nährstoffaufnahme befähigt sind (Korpinen et al., 2007). Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden untersuchten Algen nicht gegen das Wachstum von *Amphora spec.* verteidigt waren. Da die siedlungshemmende Wirkung der Extrakte nicht 100%ig war, können die festgesetzten Diatomeen wachsen. Der Beschattungseffekt durch Epibionten (Sand-Jensen & Revsbech, 1987), führt zu einer Reduzierung des verfügbaren Lichtes für den Basibionten (siehe auch Abb.5). Dieses kann zu einer Einschränkung der Photosynthese (Littler & Littler, 1999) führen und das Wachstum der Alge reduzieren (Honkanen & Jormalainen, 2005). Von *F. vesiculosus* ist bekannt, dass die tatsächliche Tiefenverbreitung nicht der physiologisch möglichen Tiefenverbreitung entspricht (Rohde, 2007). Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass wahrscheinlich biotischer Stress ausschlaggebend für die Tiefenzonierung von *F. vesiculosus* ist (Rohde, 2007; Korpinen et al., 2007).

4.2 Einfluss der Temperatur auf die Fouling-Verteidigung

Im ersten Versuch wurden *F. vesiculosus* Individuen für zwei Wochen bei verschiedenen Temperaturen gehältert. Anschließend wurden sowohl Oberflächen- als auch Gesamtextrakte hergestellt und diese dann in ihrer natürlichen Konzentration hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Ansiedlung und das Wachstum der beiden Versuchsorganismen getestet. Die Ergebnisse des ersten Versuches zeigen ein recht ähnliches Bild wie die Ergebnisse des zweiten Versuches. So inhibierten sowohl die Oberflächen- als auch die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* bei allen Temperaturen signifikant die Ansiedlung beider Versuchsorganismen (siehe Abb.8, 10, 12, 14). Ein wachstumshemmender Effekt war nur bei *B. aquimaris* zu erkennen (siehe Abb.9, 13), während das Wachstum von *Amphora spec.* durch die Oberflächenextrakte nicht gehemmt (siehe Abb.11) und durch die Gesamtextrakte (siehe Abb.15) sogar gefördert wurde. Insgesamt waren die Inhaltsstoffe der Gesamtextrakte stärker ansiedlungs- und wachstumshemmend (oder

wachstumsfördernd im Falle von *Amphora spec.*) als die Oberflächenextrakte. Da die Bestandteile der Gesamtextrakte wahrscheinlich nicht in diesen Konzentrationen an der Oberfläche der Alge vorhanden sind, lässt sich mit Hilfe der Wirkung der Gesamtextrakte keine ökologisch relevante Aussage über die Verteidigung gegen Fouling machen (de Nys et al., 1998; Nylund et al., 2007). Aus diesem Grund wurden im zweiten Versuch keine Gesamtextrakte der Algen hergestellt. Die statistische Überprüfung der Ergebnisse des ersten Versuches ergab, dass es Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturen gab (siehe Abb.9, 10, 15), insgesamt konnte man aber kein eindeutigen Effekt der Temperatur auf die Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* erkennen.

Es gab auch keinen Unterschied in der Fouling-Verteidigung zwischen unbefressenen und befreunden Algen. Der Aspekt der Fraßverteidigung wurde aus zweierlei Gründen mit in den Versuch einbezogen. Einerseits bot sich dieses aus praktischen Gründen an, da sich eine parallel durchgeführte Diplomarbeit (siehe Oschmann, 2009) mit der induzierbaren Fraßverteidigung unter Temperaturstress beschäftigte. So konnte der Versuchsaufbau gemeinsam geplant und durchgeführt werden. Andererseits konnte so die Hypothese von Jormalainen et al. (2008), dass die Verteidigung gegen Fouling und Fraß miteinander gekoppelt sind, überprüft werden. Die Temperatur hatte keinen Effekt auf die Verteidigung gegen Fouling (s.o), wohl aber auf die Verteidigung gegen Fraß (Rohde, 2007, Oschmann, 2009). Rohde (2007) fand heraus, dass die Fraßverteidigung von *F. vesiculosus* bei einer Temperatur von 20°C zusammenbricht. Eine Überprüfung dieser Aussage von Oschmann (2009) zeigte, dass nicht die 20°C - Marke entscheidend für den Zusammenbruch der Verteidigung war, sondern vielmehr der große Temperatursprung. Die An- oder Abwesenheit von Grazern wie *Idotea baltica* hatte also, ebenso wie die Temperatur, keinen Effekt auf die Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus*. Somit könnte man vermuten, dass die Verteidigung gegen Fouling nicht mit der Verteidigung gegen Fraß gekoppelt ist, sondern dass diese unabhängig voneinander zu betrachten sind. Dieses würde auch sinnvoll sein, da die Verteidigung gegen Fraß nur auf Bedarf hin, also wenn Grazer vorhanden sind, aktiviert wird (Induktion der Verteidigung durch Herbivore, z.B.: Rohde 2004, 2007). Da vor allem Bakterien aber allgegenwärtig sind (Rheinheimer, 1995), macht es Sinn wenn die Verteidigung gegen Fouling konstitutiv, also immer vorhanden, ist. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der unbelebten Oberflächen, die über die Dauer des Versuches in den Aquarien platziert wurden, unterstützt. Sie zeigen, dass der Besiedlungsdruck mit steigender Temperatur zunahm und der Aufwuchs die Transmission bei den hohen Temperaturen um bis zu 10% reduzierte. Man könnte also erwarten, dass die Algen bei höheren Temperaturen besser oder stärker gegen Fouling verteidigt sind, da der Foulingdruck hier höher ist. Dieses war aber nicht der

Fall, es war kein eindeutiger Effekt der Temperatur auf die Verteidigung gegen Fouling zu beobachten.

Vergleicht man die Ergebnisse beider Versuche miteinander, so ergeben sich einige Übereinstimmungen: alle Extrakte inhibierten die Ansiedlung beider

Versuchsorganismen und das Wachstum von *B. aquimaris*. Das Wachstum von *Amphora spec.* wurde wenn überhaupt von den Oberflächenextrakten von *F.*

vesiculosus im ersten Versuch inhibiert, die Oberflächenextrakte von *F. vesiculosus* des zweiten Versuches zeigten keine inhibierende Wirkung auf das Wachstum.

Während die Gesamtextrakte von *F. vesiculosus* eher förderlich auf das Wachstum von *Amphora spec.* wirkten, war dieses bei den Oberflächenextrakten von *F. serratus* ganz sicher so. Es scheint also so zu sein, dass die Inhaltsstoffe der Extrakte die verschiedenen Stadien der Besiedlung (Ansiedlung, Wachstum) der beiden

Versuchsorganismen unterschiedlich stark beeinflussten und nicht den

Besiedlungsprozess an sich. Dieses wurde zum Beispiel für die bakterielle

Besiedlung von *Delisea pulchra*, einer Rotalge, gezeigt (Maximilien et al., 1995, 1998). Maximilien et al. (1995, 1998) zeigte, dass die von der Alge isolierten

Bakterien sich zwar schneller ansiedeln konnten als wirtsfremden Bakterien, aber ihr anschließendes Wachstum und die Ausbreitung über die Oberfläche stark inhibiert

wurde. Dieses könnte erklären warum wirtsfremde Bakterien nicht auf der

Algenoberfläche vorhanden sind und die wirtseigenen Bakterienstämme nur in

begrenzter Abundanz. Es ist bekannt, dass die von *Delisea pulchra* produzierten Furanone strukturell den Signalmolekülen des AHL-Regulationssystems, mit deren

Hilfe gramnegative Bakterien ihren Wachstumsprozess auf Oberflächen steuern,

ähneln. Durch die Furanone kommt es zu einer kompetitiven Hemmung, so dass *D.*

pulchra ausschließlich von grampositiven Bakterien bewachsen ist, die im marinen

Milieu nicht sehr häufig sind (Kjelleberg & Steinberg, 2001). Eine andere Studie mit

Oberflächenextrakten von *Delisea pulchra* (Dworjanyn et al., 2006), die hinsichtlich

ihrer Wirkung auf die Ansiedlung von Algensporen (heimischen epiphytischen Algen)

getestet wurden, zeigte, dass die Oberflächenextrakte die Ansiedlung der

potentiellen Fouling-Organismen in ökologisch relevanten Konzentrationen inhibierte.

Somit sind Furanone in *Delisea pulchra* Bestandteil der chemischen Verteidigung,

sowohl gegen Bakterien (Maximilien, 1995, 1998; Kjelleberg & Steinberg, 2001) als

auch gegen epiphytische Algen (Dworjanyn et al., 2006).

Dieser Vergleich zeigt, dass weiterer Forschungsbedarf vorhanden ist. Denn obwohl

gerade *F. vesiculosus* eine sehr gut untersuchte Makroalge ist, bleiben viel Fragen

offen, zum Beispiel welche der Inhaltsstoffe zur Verteidigung gegen Fouling und Fraß

beitragen oder welche Rolle den viel diskutierten Phlorotanninen nun tatsächlich

zukommt.

4.3 Methodendiskussion

Wie wohl bei allen Arbeiten, wurde ein großer Anteil der zur Verfügung stehenden Zeit mit dem Versuchsaufbau, Diskussionen über die Vorhergehensweise und Methoden und Probleme zugebracht. Einige der Diskussionspunkte sollen hier im Folgenden dargestellt werden.

Mittlerweile gibt es viele Studien über Algenextrakte, die Antifouling-Aktivitäten zeigten (Hellio et al., 2000, 2001; Dworjanyn et al., 2006; Paul et al., 2006; Nylund et al., 2007; reviewed by Bhadury & Wright, 2004). Dennoch fehlt eine Standardmethode zur Bestimmung ökologisch relevanter Konzentrationen von Oberflächenmetaboliten (de Nys et al., 1998). Um die ökologische Rolle und Bedeutung die sekundärer Metabolite als Vermittler von Interaktionen spielen besser verstehen zu können, benötigt man deren Konzentration unmittelbar an der Oberfläche. De Nys et al. (1998) versuchte als erstes eine solche Standardmethode für die Extraktion und Quantifikation von Oberflächenmetaboliten zu entwickeln. Dabei wurden verschiedene Algen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln unterschiedlich lange extrahiert und die Oberfläche der Algen mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops auf Zellschäden hin untersucht (de Nys et al., 1998). Extraktionszeiten bis 30s in Hexan verursachten keine Zellschäden. Somit eignet sich diese sogenannte „dipping“-Methode von de Nys (1998) gut zur Extraktion unpolarer Metabolite von Algenoberflächen. Sie wurde von Nylund et al. (2007) erweitert. Nylund et al. (2007) und andere (z.B. Dworjanyn et al., 2006) haben gezeigt, dass man mit Hilfe von Oberflächenextrakten, aber nicht mit Gesamtextrakten, gute Vorhersagen über die Fouling-Verteidigung im Freiland machen kann. Die Extrakte mit der stärksten inhibitorischen Wirkung auf natürlich vorkommende Fouling-Organismen in Bioassays stammten von solchen Algen, die im Freiland im Vergleich zu den anderen getesteten Algen, sehr wenig bewachsen waren (Nylund et al., 2007). Alle diese Beispiele beschäftigten sich mit Rotalgen, bei denen die Antifouling-Eigenschaften der durchweg unpolaren Oberflächenextrakte (Nylund et al., 2007) vermutlich durch Furanone (Dworjanyn et al. 2006) zu erklären ist. Da man bei Braunalgen, die in meinem Fall extrahiert werden sollten, nicht weiß welche Stoffe für eine Fouling-Verteidigung in Frage kommen, sollten wenn möglich alle vorhandenen Oberflächenmetabolite extrahiert werden, sowohl unpolare als auch polare. Daher wurde für die Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch aus Hexan und Methanol (1:1) gearbeitet. Da bekannt ist das Methanol sehr aggressiv ist und schnell Zellschäden verursachen kann (de Nys et al. 1998) wurde die jeweilige Alge lediglich für 10 Sekunden dem Lösungsmittelgemisch ausgesetzt, wobei fraglich bleibt, ob die unpolaren Stoffe vollständig oder nur teilweise extrahiert wurden. Vielleicht wäre es bei einer erneuten Extraktion sinnvoller mit beiden Lösungsmitteln

nacheinander zu extrahieren, so dass man eine unpolare und eine polare Fraktion erhält, die man in den Bioassays dann auch getrennt testen könnte. Dadurch könnte man vielleicht die Aussagekraft der Bioassays erhöhen und den Effekt der Extrakte detaillierter beschreiben. Dann könnte man eventuell erkennen, dass der inhibitorische Effekt auf die unpolaren oder polaren Extraktbestandteilen zurück zu führen ist. Aufgrund der hier durchgeführten Extraktion aller Oberflächenmetabolite (unpolarer und polarer) kann ich nur sagen, ob es Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Extrakten der Algen bei den verschiedenen Temperaturen oder Tiefen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Ansiedlung oder das Wachstum der beiden Versuchsorganismen gab, aber nicht ob diese Unterschiede durch polare oder unpolare Substanzen hervorgerufen wurden. Auch hatte ich leider nur sehr geringe Extraktmengen zur Verfügung (v.a. im ersten Versuch), so dass nur eine begrenzte Anzahl an Versuchen für die Bioassays blieb, um die Wirkung der Extrakte zu untersuchen. Darum wurden als Versuchsorganismen ein mariner Bakterienstamm (*B. aquimaris*) und eine Diatomee (*Amphora spec.*) ausgewählt, um neben der bakteriellen Besiedlung den darauf folgenden Schritt im Fouling-Prozess (einzellige Eukaryoten, siehe Einleitung) auch beobachten zu können. Hätte man größere Extraktmengen für die Bioassays zur Verfügung gehabt, hätte man diese gegen weitere potentielle Fouling-Organismen testen können, z. B. gegen eine Meerwasser-Bakteriengemeinschaft aus der Kieler Förde oder gegen andere Bakterienstämme und Diatomeenarten. Durch die Fluoreszenz-Messungen mit Hilfe des Plate Readers, mit denen die Bioassays durchgeführt wurden, kann man lediglich sagen ob in einem well im Vergleich zu anderen wells mehr Zellen vorhanden sind oder nicht, aber nicht wie viele. Das Problem ist, dass man die relativen Fluoreszenzwerte nicht proportional mit der Zellzahl in Verbindung bringen kann. Dieses zeigte sich bei einem Vorversuch, bei dem Verdünnungsstufen hergestellt wurden und diese wurden sowohl per Fluoreszenz mit Hilfe des Plate Readers gemessen als auch mit Dapi gefärbt und ausgezählt (Epifluoreszenzmikroskop). Somit kann man die Fluoreszenzwerte der Messungen nicht in eindeutige Zellzahlen umrechnen. Trotzdem konnte man sagen, ob und wo Unterschiede zwischen Extrakte und Kontrollen vorhanden waren.

4.4 Zusammenfassung

Abschließend kann man sagen, dass die Bioassays, trotz aller methodischer Probleme, Aussagen über die Fouling-Verteidigung von *F. vesiculosus* und *F. serratus* zulassen. So wirkten die in den Oberflächen- und Gesamtextrakten enthaltenden Inhaltsstoffe von *F. vesiculosus* und *F. serratus* in ökologisch relevanter

Konzentration inhibierend auf den Ansiedlungsprozess beider Versuchsorganismen und das Wachstum von *B. aquimaris*, während das Wachstum von *Amphora spec.* nicht signifikant inhibiert wurde. Das zeigt, dass bestimmte Stadien im Besiedlungsprozess inhibiert wurden und nicht die Besiedlung an sich. Abiotische Faktoren wie die Temperatur, bzw. eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur, und die Tiefe hatten keinen Einfluss auf die Stärke der Verteidigung gegen Fouling, ebenso wenig die An- oder Abwesenheit von Grazern. Das lässt vermuten, dass die Verteidigung gegen Fouling konstitutiv und nicht mit der induzierbaren Verteidigung gegen Herbivorie gekoppelt, sondern unabhängig dieser zu betrachten ist. Welche Inhaltsstoffe der Algen zur Verteidigung gegen Fouling (und Herbivorie) beitragen, bleibt zu klären.

Anhang: f/2 Medium

References: Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J. Microbiol.* 8: 229-239. / Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding

Reference: P Golven & P. Dion (1988): La culture de *Laminaria hyperborea*: ensemencements sur filieres et suivi en mer des premiers stades de developpement. – Rapport R38, C.E.V.A., Pleubian, France, 18pp. marine invertebrates. In « Culture of Marine Invertebrate Animals » (eds : Smith W.L. and Chanley M.H.) plenum Press, New York, U.S.A. pp 26-60.

Prepare the following stock solutions in deionized water:

1. NaNO₃ 75 g/L

Autoclave.

2. NaH₂PO₄*H₂O 5 g/L

Autoclave.

3. Na₂SiO₃*9H₂O 30 g/L

Autoclave.

4. Trace metal solution

FeCl₃*6H₂O 1.3 g/1L

Na₂EDTA*2H₂O 8.7 g/1L

CuSO₄*5H₂O 980 mg/100 mL 1 mL

Na₂MoO₄*2H₂O 630 mg/100 mL 1 mL

ZnSO₄*7H₂O 2.2 g/100 mL 1 mL

CoCl₂*6H₂O 1.0 g/100 mL 1 mL

MnCl₂*4H₂O 18 g/100 mL 1 mL

Solution will initially be cloudy. Add 1 N NaOH to adjust pH to about 4.5; solution should be clear unless too much NaOH has been added. Autoclave.

5. Vitamin solution:

Vitamin B12 1 mg/L

Biotin 1 mg/L (dissolve in a little NaOH first)

Thiamine HCl 200 mg/L

Store aliquots in freezer.

Per L of autoclaved seawater add aseptically:

1 ml of 1

1 ml of 2

1 ml of 3

1 ml of 4

0.5 ml of 5

Danksagung:

Bei Prof. Dr. Martin Wahl möchte ich mich für die Betreuung meiner Diplomarbeit bedanken.

Danke auch an die Arbeitsgruppe für die vielen guten Ratschläge, die tatkräftige Unterstützung und das gemeinschaftliche Miteinander.

Yvonne, dir möchte ich dafür danken, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest, ganz egal um welche Themen es sich handelte.

Meiner Familie danke ich für den Glauben an mich und dafür, dass ihr mich immer unterstützt haben, egal in welcher Form.

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich für die Diskussionen und Stunden der Entspannung bedanken und dafür, dass ihr immer für mich da wart, in guten wie auch in schlechten Zeiten.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit „Aspekte der chemischen Verteidigung gegen Fouling bei Makroalgen“ selbstständig verfasst wurde und keine anderen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden, als die hier Angegebenen.

Kiel, den 8.2.2009 (Kristina David)

Ich erkläre mich damit einverstanden, die von mir angefertigte Version meiner Diplomarbeit in der Universitätsbibliothek auszulegen.

Kiel, den 8.2.2009 (Kristina David)

Literaturverzeichnis:

- Armstrong E, Boyd KG, Burgess JG (2000). Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology Annual Review* 6, 221-241.
- Babernerd B, Gerlach SA (1987). Bathymetry and sediments of Kieler Bucht, in *Seawater-Sediment Interactions in Coastal Waters*. Springer, Berlin.
- Bakus GJ, Targett NM, Schulte B (1986). Chemical ecology of marine organisms: An overview. *Journal of Chemical Ecology* 12 (5), 951-987.
- Bers AV, Wahl M (2004). The influence of natural surface microtopographies on fouling. *Biofouling* 20, 43 – 51.
- Bers AV, Prendergast GS, Zürn CM, Head RM, Hansson L, Thomason JC (2006). A comparative study of the antissettlement potential of mytilid shells. *Biology Letters* 2, 88-91.
- Bers AV, D´Souza F, Klijnsstra JW, Willemsen PR, Wahl M (2006). Chemical defense in mussels: antifouling effect of crude extracts of the periostracum of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biofouling* 22, 251-259.
- Bhadury P, Wright PC (2004). Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta* 219, 561-578.
- Brock E, Nylund GM, Pavia H (2007). Chemical inhibition of barnacle larval settlement by the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 337, 165-174.
- BSH (2008). Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie, Baltic Sea SST 2007, URL;http://www.bsh.de/Meeresdaten/Beobachtungen/Meeresoberflächentemperatur/SST_d.jsp#0
- Callow ME, Callow JA (2002). Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist* 49, 1-5.
- Chambers LD, Stokes KR, Walsh FC, Wood RJK (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface & Coating Technology* 201, 3642-3652.
- Characklis, WG (1981). Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol. Bioengng* 23, 1923-1960.
- Clare AS (1996). Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling* 9, 211-229.
- Corpe, WA (1982). Microbial attachment and growth on solid surfaces. *Conf. Progr. Chem. Disinfec. New concepts and materials*, 1982, New York, p. 35-43.
- Correa JA & Sanchez PA (1996). Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia* 326/327, 89-96.
- Cuba TR, Blake NJ (1983). The initial development of a marine fouling assemblage on a natural substrate in a subtropical estuary. *Botanica mar.* 26, 259-264.
- De Nys R, Dworjanyn SA, Steinberg PD (1998). A new method for determining surface concentrations of marine natural products on seaweeds. *Marine Ecology Progress Series* 162, 79–87.
- De Nys S, Steinberg PD, Rogers CN, Charlton TS & Duncan MW (1996). Quantitative variation of secondary metabolites in the sea hare *Aplysia parvula* and its host plant, *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series* 130, 135-146.
- Dixon J, Schroeter SC, Kastendiek, J (1981). Effects of encrusting bryozoan, *Membranipora membranacea*, on the loss of blades and fronds by the giant kelp, *Macrocystis pyrifera* (Laminariales). *J. Phycol.* 17, 341-345.
- Dworjanyn SA, de Nys R, Steinberg PD (2006). Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series* 318, 153–163.
- Engel S, Jensen PR, Fenical W (2002). *Chemical Ecology Of Marine Microbial*

- Defense. *Journal of Chemical Ecology* 28, 1971-1985.
- Engkvist R, Malen T, Tobiasson S (2000). Density dependent grazing effects of the isopod *Idotea baltica*, Pallas, on *Fucus vesiculosus*, L., in the Baltic Sea. *Aquatic Ecology* 34, 253-260.
- Faulkner DJ (1996). Marine natural products. *Natural Products Reports* 13, 75–125.
- Ferreira S, Seelinger U (1985). The colonization process of algal epiphytes on *Ruppia maritima* L. *Botanica mar.* 28, 245-249.
- Fürhaupter K, Wilken H, Meyter T (2003). Kartierung mariner Pflanzenbestände im Flachwasser der schleswig-holsteinischen Ostseeküste. *Bericht für LANU, Schleswig-Holstein* 250.
- Fürhaupter K, Wilken H, Meyter T (2006). Praxistest zum Makrophytenmonitoring in Schleswig-Holstein. *Bericht für LANU (2006), Schleswig-Holstein*.
- Hellio C, Bremer G, Pons AM, Le Gal Y, Bourgougnon N (2000). Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 543-549.
- Hellio C, De La Broise D, Dufosse L, Le Gal Y, Bourgougnon N (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae : potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research* 52, 231-247.
- Hemmi A, Jormalainen V (2004). Geographic covariation of chemical quality of the host alga *Fucus vesiculosus* with fitness of the herbivorous isopod *Idotea baltica*, *Marine Biology* 145, 759-768.
- Henry BE, van Alstyne KL (2004). Effects of UV-Radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J. Phycol.* 40, 527-533.
- Holmström C & Kjelleberg S (1994). The effect of external biological factors on settlement of marine invertebrate larvae and new antifouling technology. *Biofouling* 8, 147–160.
- Honkanen T, Jormalainen V (2005). Genotypic variation in tolerance and resistance to fouling in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 144, 196-205.
- Ianora A, Boersma M, Casotti R, Fontana A, Harder J, Hoffmann F, Pavia H, Potin P, Poulet SA, Toth G (2006). The H.T. Odum Synthesis Essay, *New Trends in Marine Chemical Ecology. Estuaries and Coasts* 29, 531-551.
- Jormalainen V, Honkanen T, Heikkilä N (2001). Feeding preferences and performance of a marine isopod on seaweed hosts: cost of habitat specialisation. *Marine Ecology Progress Series* 220, 219-230.
- Jormalainen V, Honkanen T, Koivikko R, Eränen J (2003). Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics?. *OIKOS* 103, 640-650.
- Jormalainen V, Wikström SA, Honkanen T (2008). Fouling mediates grazing: intertwining of resistance to multiple enemies in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 155, 559-569.
- Kangas P, Autio H, Haellfors G, Luther H, Niemi A, Salemaa H (1982). A General Model of the Decline of *Fucus vesiculosus* at Tvaerminne, South Coast of Finland in 1977-81. *Acta Botanica Fennica* 118, 1-27.
- Kautsky N, Kautsky H, Kautsky U, Waern M (1986). Decreased depth penetration of *Fucus vesiculosus* (L.) since the 1940's indicates eutrophication of the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series* 28, 1-8.
- Karez R, Engelbert S, Sommer U (2000). Co-consumption and protective coating: two new proposed effects of epiphytes on their macroalgal hosts in mesograzers-epiphyte-host interactions. *Marine Ecology Progress Series* 205, 85-93.
- Kjelleberg S, Steinberg P (2001). Surface warfare in the sea. *Microbiology Today* 28, 134-135.

- Kjelleberg S, Steinberg PD (2002). Defenses against bacterial colonisation of marine plants, pp. 152-172, in S. Society Press. St. Paul, Minnesota.
- Koie M, Kristiansen A (2001). Der große Kosmos Standführer. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart.
- Kubanek J, Lester SE, Fenical W, Hay ME (2004). Ambiguous role of phlorotannins as chemical defenses in the brown alga *Fucus vesiculosus*. Marine Ecology Progress Series 277, 79-93.
- Littler MM & Littler DS (1995). Impact of CLOD pathogen on Pacific coral reefs. Science 267, 1356-1360.
- Maximilien R (1995). Inhibition of bacteria by seaweed secondary metabolites. BSc Honours Thesis, UNSW, Sydney, Australia.
- Maximilien R, de Nys R, Holmström C, Gram L, Givskov M, Crass K, Kjelleberg S, Steinberg PD (1998). Chemical mediation of bacterial surface colonization by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. Aquat. Microb. Ecol. 15, 233-246.
- Nylund GM, Gribben PE, de Nys R, Steinberg PD, Pavia H (2007). Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. Marine Ecology Progress Series 329, 73-84.
- Paul NA, de Nys R, Steinberg PD (2006). Chemical defense against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. Marine Ecology Progress Series 306, 87-101.
- Paul VJ, Puglisi MP, Ritson-Williams R (2006). Marine chemical ecology. Natural Product Reports 23, 153-180.
- Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Åberg P (1997). Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Marine Ecology Progress Series 157, 139-146.
- Pavia H, Toth G, Åberg P (1999). Trade-offs between phlorotannin production and annual growth in natural populations of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Journal of Ecology 87, 761-771.
- Pavia H, Toth GB (2000). Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. Hydrobiologia 440, 299-305.
- Rao D, Webb JS, Kjelleberg (2006). Microbial Colonization and Competition on the Marine Alga *Ulva australis*. Applied And Environmental Microbiology 72, 5547-5555.
- Reichelt JL & Borowitzka MA (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large scale screening programme. Hydrobiologia 116/117, 158-168.
- Rheinheimer G (1995). Meereskunde der Ostsee. Zweite Auflage, Springer, Berlin.
- Rohde S, Molis M, Wahl M (2004). Regulation of anti-herbivore defense by *Fucus vesiculosus* in response to various cues. Journal of Ecology 92, 1011-1018.
- Rohde S, Wahl M (2007). Defense reactions of *Fucus vesiculosus* – Today, tomorrow or next week?. 42nd European Marine Biology Symposium, p. 183.
- Sand-Jensen K, Revsbech NP (1987). Photosynthesis and light adaptation in epiphyte-macrophyte associations measured by oxygen microelectrodes. Limnol. Oceanogr. 32 (2), 452-457.
- Schaffelke B, Evers D, Walkorn A (1995). Selective grazing of the isopod *Idotea baltica* between *Fucus evanescens* and *Fucus vesiculosus* from Kiel Fjord (western Baltic). Marine Biology 124, 215-218.
- Schramm W, Nienhuis P (1996). Marine Benthic Vegetation – Recent Changes and the Effect of Eutrophication. Springer, Berlin.
- Slattery M, McClintock JB & Heine JN (1995). Chemical defenses in Antarctic soft

- corals evidence for antifouling compounds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 190, 61–77.
- Steinberg PD, Schneider R, Kjelleberg S (1997). Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation* 8, 211-220.
- Toth G, Langhamer O, Pavia H (2005). Inducible and constitutive defense of valuable seaweed tissues: consequences for herbivore fitness. *Ecology* 86, 612-618.
- Underwood AJ (1990). Experiments in ecology and management: Their logics, functions and interpretations. *Australian journal of ecology*. Oxford, 15.
- Vogt H, Schramm W (1991). Conspicuous decline of *Fucus* in Kiel Bay (Western Baltic): What are the causes?. *Marine Ecology Progress Series* 69, 189-194.
- Wahl M (1989). Marine Epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58, 175–189.
- Wahl M, Jensen PR, Fenical W(1994). Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. *Marine Ecology Progress Series* 110, 45–57.
- Wahl M, Hay ME (1995). Associational resistance and shared doom: effects of epibiosis on herbivory. *Oecologia* 102, 329-340.