

Bachelorarbeit

Aktivität von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels
juveniler Entwicklungsstadien von *Sardinops sagax*
und *Engraulis capensis* aus dem
Nördlichen Benguela Auftriebsgebiet



Fachbereich 02: Biologie/ Chemie
Studiengang Biologie



Abteilung Ökologie
AG Ökophysiologie

eingereicht von:		Sonja-Franziska Heeling
geboren am:		15.11.1985, Coesfeld
Matrikelnummer:		2427409
Betreuung:	1. Betreuer	Prof. Dr. Matthias Wolff
	2. Betreuer	Dr. Andreas Kunzmann
eingereicht am:		05.09.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Figuren	V
Tabellen	VI
1 Einleitung	1
2 Material	3
2.1 Herkunftsgebiet der Larven	3
2.2 Organismus	4
2.3 Auswahl der Proben	5
3 Methoden	8
3.1 Messung der metabolischen Schlüsselenzyme	8
3.2 Präparation.....	8
3.2.1 Herstellung des Extraktes	9
3.2.2 Pyruvat-Kinase (PK) Aktivität	9
3.2.3 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität	10
3.2.4 Citrat-Synthase (CS) Aktivität.....	11
3.2.5 Berechnung der Enzymaktivität.....	12
3.3 Einstellen der Methode	13
3.4 Datenanalyse und Auswertung	13
4 Ergebnisse	14
4.1 Proben von PK, LDH und CS.....	14
4.2 Aktivität der Stoffwechsellzyme	18
4.2.1 Intraspezifischer Vergleich	18
4.2.2 Physiologische Parameter.....	19
4.2.3 Interspezifischer Vergleich	28
5 Diskussion	31
5.1 Methodendiskussion.....	31
5.2 Spezifische Enzymaktivität und intraspezifischer Vergleich	31
5.3 Metabolic Scaling	33
6 Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis	36
Eigenständigkeitserklärung	
Anhang	Rohdaten CD-Rom

Abkürzungen

Ac-CoA	Acetyl-Coenzym-A
ADP-K-Salt	Adenosindiphosphatkaliumsalz
ATP	Adenosintriphosphat
ANC	Südafrikanische Sardelle
BCLME	Benguela Auftriebsgebiet (B enguela C urrent L arge M arine E cosystem)
CS	Citrat-Synthase
DO	gelöster Sauerstoff (dissolved oxygen)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GENUS	Geochemistry and Ecology of Namibian Upwelling System
HOM	Homogenisationspuffer
INT	Iodonitrotetrazolium-Chlorid
KCL	Kaliumchlorid
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBUS	nördliches Benguela Auftriebsgebiet
Ox-Ac	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
pers. Komm.	persönliche Kommunikation
PK	Pyruvat-Kinase
Pyr	Pyruvat
SAR	Südafrikanische Sardine
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
WM	Frischgewicht (wet mass)

Figuren

Fig 1: Karte des BCLME	3
Fig 2: Südafrikanische Sardine (<i>Sardinops sagax</i>)	4
Fig 3: Südafrikanische Sardelle (<i>Engraulis capensis</i>)	5
Fig 4: Verlauf der Absorptionsänderung bei PK aus SAR	16
Fig 5: Verlauf der Absorptionsänderung bei PK aus SAR	17
Fig 6: Verlauf der Absorptionsänderung bei PK aus ANC	17
Fig 7: Absorptionsänderung bei LDH aus SAR	18
Fig 8: Allometrische Beziehung bei PK aus SAR	22
Fig 9: Allometrische bei PK aus ANC	23
Fig 10: Allometrische Beziehung bei LDH aus SAR	24
Fig 11: Allometrische Beziehung bei LDH aus ANC	25
Fig 12: Allometrische Beziehung bei CS aus SAR	26
Fig 13: Allometrische Beziehung bei CS aus ANC	27
Fig 14: Inter-/ intraspezifischer Vergleich der PK-Aktivität bei SAR und ANC	29
Fig 15: Inter-/ intraspezifischer Vergleich der LDH-Aktivität bei SAR und ANC	29
Fig 16: Inter-/ intraspezifischer Vergleich der CS-Aktivität bei SAR und ANC	30

Tabellen

Tab 1: Übersicht über die beprobten Stationen von SAR und ANC	6
Tab 2: Überblick GENUS Ausfahrten	7
Tab 3: Volumina zur Messung der PK-Aktivität bei SAR und ANC	10
Tab 4: Volumina zur Messung der LDH-Aktivität bei ANC und SAR	11
Tab 5: Einfluss unterschiedlicher Extraktmengen auf die PK-Aktivität	14
Tab 6: Einfluss unterschiedlicher Extraktmengen auf die LDH-Aktivität.....	15
Tab 7: Allometrische Koeffizienten und Regressions-Statistik	21
Tab 8: Konditionsfaktor und Koeffizienten der Gewicht-Länge-Beziehung sowie Regressions-Statistik	28

1 Einleitung

Vor der Südwestküste Namibias und Südafrikas befindet sich das Benguela Auftriebsgebiet. Es erstreckt sich, von der Küste bis zu einer Tiefe von 200m, über eine Fläche von 110.000 km² (Bianchi *et al.*, 1999) und stellt eines der vier großen Auftriebsgebiete der Weltmeere dar. Kaltes nährstoff- und sauerstoffreiches Tiefenwasser wird durch von Winden angetriebenen Strömungen an die Oberfläche gedrückt und bildet die Basis für eine hohe Primärproduktion. Dadurch kommt es hier zu einer großen Anzahl von Zooplankton sowie zu großen Beständen pelagischer Fischarten. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte änderte sich sowohl die Struktur als auch die Funktion des Ökosystems (=“regime shift“; Shannon und O`Toole, 2003), ebenso kam es zu Änderungen in der Artenzusammensetzung. Begünstigt und verschärft wurden diese Veränderungen im nördlichen Benguela Auftriebsgebiet durch eine Überfischung der dominanten Arten und Fängen in hohen Trophiestufen („fishing down the food web“; Heymans, 2004) Abweichende ozeanografische Konditionen sowie sich ausbreitende Hypoxie in den Schelfgewässern und Phänomene wie Benguela Niño 1995, führen zu einem „top down“ Effekt (Boyer *et al.*, 2010). Ein weiterer Grund kann die in einigen Gebieten auftretende Sulfatreduktion durch anoxische Bakterien sein. Das aufsteigende giftige Sulfid (H₂S) entzieht dem Wasser Sauerstoff und verursacht Massensterben mariner Organismen (Bianchi *et al.*, 1999). So wurden im nördlichen Benguela Auftriebsgebiet starke Fluktuationen der Sardinen- und Sardellenpopulation nachgewiesen, wobei es zu einer Dominanz beider Arten, oder jeweils einer Art und seit den späten 80ern sogar zum Ausbleiben beider Arten kam (Cury und Shannon, 2003), sodass das Gebiet heute von Hecht (*Merluccius capensis*) und Makrele (*Trachurus trachurus capensis*) dominiert wird (Bianchi *et al.*). Die genauen Gründe hierfür sind nicht bekannt. Vermutet wird, dass die sich ausbreitende Hypoxie unter anderem die Entwicklung und Verbreitung der Larven und Juvenilen stark beeinträchtigt. Adulte können ungünstigen Umweltbedingungen in Form von Migration ausweichen oder sich durch Änderung der Stoffwechselaktivität anpassen, wohingegen Larven und Juvenile sensibler auf reduzierten Sauerstoffgehalt reagieren. Um in einer solchen Umgebung überleben zu können, müssten sie physiologische und biochemische Anpassungen zeigen (Ekau *et al.*, 2010).

Das Messen von Aktivitäten metabolischer Schlüsselenzyme erlaubt eine Einschätzung des metabolischen Leistungsvermögens und lässt Rückschlüsse über den physiologischen Zustand der untersuchten Organismen zu. Hierzu werden Enzyme aus unter-

schiedlichen Stoffwechselwegen verwendet. Aktivitäten von Laktat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus der Glykolyse zeigen das anaerobe Potential eines Stoffwechsels (Berges *et al.*, 1990; Berges und Ballantyne, 1991), wohingegen die Citrat-Synthase als Marker-Enzym für den mitochondriellen aeroben Stoffwechsel dient (Clarke *et al.*, 1992). Mithilfe spektrophotometrischer Analysen lassen sich die Aktivitäten solcher Enzyme ermitteln und erlauben inter- und intraspezifische Vergleiche ebenso wie das Detektieren eventueller Auswirkungen von Änderungen der Umweltbedingungen.

Im Zuge der folgenden Arbeit wurden Basiswerte metabolischer Schlüsselenzyme juveniler Sardinen, *Sardinops sagax*, und Sardellen, *Engraulis capensis*, gemessen. Aufgrund der geringen Bestände wird angenommen, dass diese pelagischen Arten eine geringere Toleranzgrenze bei niedrigem Sauerstoffgehalt haben als zum Beispiel Makrele (*Trachurus trachurus capensis*) und Hecht (*Merluccius capensis*). Dementsprechend wurden Reaktionsgeschwindigkeiten aerober (Citrat-Synthase, CS) und anaerober (Pyruvat-Kinase, PK; Laktat-Dehydrogenase, LDH) Stoffwechsellzyme ermittelt, an Hand von Proben aus unterschiedlichen Bereichen des nördlichen Benguela Auftriebsgebietes.

Die Hauptziele dieser Arbeit waren:

- 1) das Einstellen der Methode für Sardine und Sardelle
- 2) die Ermittlung von Basiswerten mitochondrieller und glykolytischer Enzymaktivitäten ebendieser Arten
- 3) die Einschätzung der Beziehung zwischen Stoffwechsellzymen und physiologischen Merkmalen

Hypothesen:

1. Es besteht eine Korrelation zwischen Enzymaktivitäten und der Körpergröße der Fischlarven.
2. Zwischen juvenilen Sardinen aus nördlichen und südlichen Gebieten bestehen Unterschiede in der Enzymaktivität.
3. Ein intraspezifischer Vergleich der Aktivitäten juveniler Sardinen und Sardellen mit der Kap-Bastardmakrele (*Trachurus trachurus capensis*) zeigt einen signifikanten Unterschied.

2 Material

2.1 Herkunftsgebiet der Larven

Das Benguela Auftriebsgebiet (Benguela Current Large Marine Ecosystem, BCLME), befindet sich im Süd-Ost-Atlantik vor der Küste Südwest Afrikas und erstreckt sich im Süden vom Kap der Guten Hoffnung (34°S) nordwärts bis zur Angola-Benguela-Front (15°S) (Bianchi et al., 1999). Es gehört zu den vier großen Küstenauftriebsgebieten der Welt. Im Norden wird es begrenzt durch die Angola-Benguela-Front und im Süden durch die Agulhasströmung und ihre Retroflexionszone. So werden sowohl die südlichen als auch die nördlichen Grenzen durch Warmwasser-Systeme gebildet, was das Benguela Auftriebsgebiet einzigartig macht. Der Hauptauftrieb befindet sich in der Höhe von Lüderitz und teilt das BCMLE in zwei Teilsysteme, das nördliche und das südliche Benguela-System. Starke äquatorial gerichtete Winde, angetrieben durch das Südatlantikhoch über Westafrika, führen zu einer Strömung, die das warme Oberflächenwasser seewärts treibt. So wird kaltes, nährstoff- und sauerstoffreiches Tiefenwasser aus dem Antarktistrom an der Küste an die Oberfläche getrieben. Dieser Auftrieb ist die Grundlage für die hohe Primärproduktion von $1.25 \text{ kg} \cdot \text{C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{y}^{-1}$ (Shannon und O'Toole, 2003), welche wiederum zu einer hohen Biodiversität und Biomasse an Zooplankton, Fischen, Seevögeln und marinen Säugetieren führt. Bedingt durch kurzzeitige und saisonale Unter-

gehört zu den vier großen Küstenauftriebsgebieten der Welt. Im Norden wird es begrenzt durch die Angola-Benguela-Front und im Süden durch die Agulhasströmung und ihre Retroflexionszone. So werden sowohl die südlichen als auch die nördlichen Grenzen durch Warmwasser-Systeme gebildet, was das Benguela Auftriebsgebiet einzigartig macht. Der Hauptauftrieb befindet sich in der Höhe von Lüderitz und teilt das BCMLE in zwei Teilsysteme, das nördliche und das südliche Benguela-System. Starke äquatorial gerichtete Winde, angetrieben durch das Südatlantikhoch über Westafrika, führen zu einer Strömung, die das warme Oberflächenwasser seewärts treibt. So wird kaltes, nährstoff- und sauerstoffreiches Tiefenwasser aus dem Antarktistrom an der Küste an die Oberfläche getrieben. Dieser Auftrieb ist die Grundlage für die hohe Primärproduktion von $1.25 \text{ kg} \cdot \text{C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{y}^{-1}$ (Shannon und O'Toole, 2003), welche wiederum zu einer hohen Biodiversität und Biomasse an Zooplankton, Fischen, Seevögeln und marinen Säugetieren führt. Bedingt durch kurzzeitige und saisonale Unter-

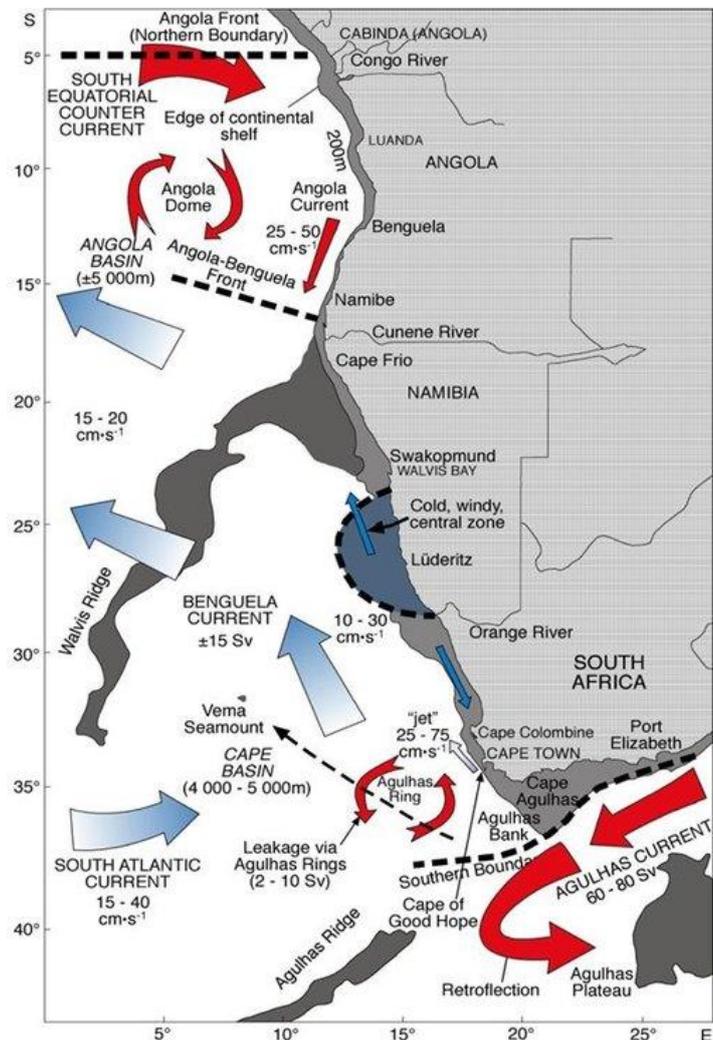


Fig 1: Externe und interne Grenzen des BCLME, Topografie und Oberflächenströmungen (Shannon und O'Toole, 2003)

Dieser Auftrieb ist die Grundlage für die hohe Primärproduktion von $1.25 \text{ kg} \cdot \text{C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{y}^{-1}$ (Shannon und O'Toole, 2003), welche wiederum zu einer hohen Biodiversität und Biomasse an Zooplankton, Fischen, Seevögeln und marinen Säugetieren führt. Bedingt durch kurzzeitige und saisonale Unter-

schiede der Winde, der Topografie und der Küstenlinie ist die Intensität des Auftriebes nicht überall gleich. Dies führt dazu, dass es im nördlichen Gebiet vor allem im Winter und Frühjahr, im südlichen Teil jedoch hauptsächlich im Frühjahr und Sommer zu starkem Auftrieb kommt. Eine weitere Umweltbedingung des nördlichen Benguela-Systems ist, dass das auftriebende Wasser hier teilweise anoxisch ist, bedingt durch hohe Sedimentation und darauf folgende Zersetzung organischen Materials, ebenso wie das Zufließen sauerstoffarmen Wassers aus dem Angola-Dome (Bianchi *et al.*, 1999). Seit 1994 haben sich diese bleibenden und ausgeprägten hypoxischen Verhältnisse jedoch im gesamten Schelfgebiet vor Nord- und Zentral-Namibia ausgebreitet (Hamukaya *et al.*, 1998). Von Hypoxie spricht man bei $DO < 1,4 \text{ ml O}_2/\text{L}$ ($< 60 \mu\text{mol O}_2/\text{L}$, $< 2 \text{ mg O}_2/\text{L}$; Ekau *et al.*, 2010).

2.2 Organismus

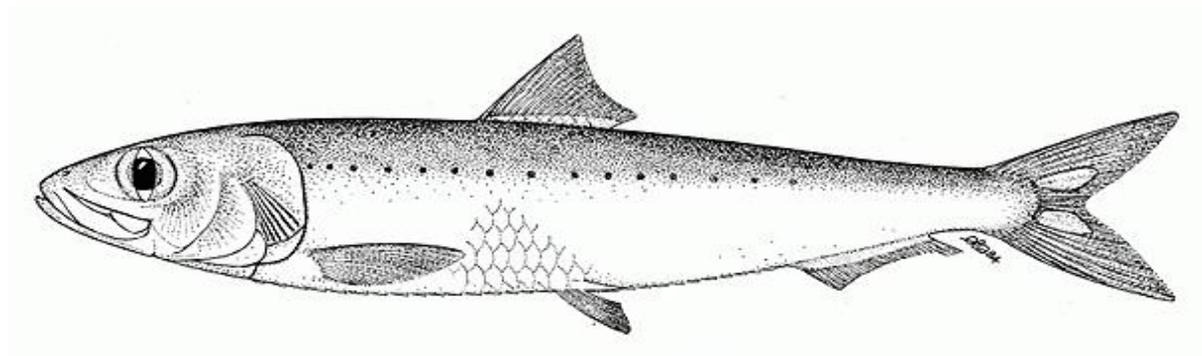


Fig 2: Südafrikanische Sardine (FAO Species catalogue Vol. 7. Clupeoid fishes of the world. Suborder *CLUPEOIDEI*), Quelle: <http://www.fao.org/fishery/species/2895/en>

Südafrikanische Sardine (*Sardinops sagax*)

Die Südafrikanische Sardine, *Sardinops sagax* (Synonym: *Sardinops ocellata*), gehört zur Gattung *Sardinops* (Pseudosardine) aus der Familie der Clupeiden (Heringsartige). Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich von der Südküste Südafrikas bis nach Süd-Angola. Diese pelagische Art wird normalerweise 25cm lang, kann aber eine maximale Länge von 30cm erreichen. Sie lebt in küstennahen Gewässern und bildet große Schwärme. Juvenile ernähren sich von Zooplankton (hauptsächlich Copepoden), wohingegen sie in späteren Lebensstadien (ab 10cm) Opportunisten sind und sowohl Phyto- als auch

Zooplanton fressen. Südafrikanische Sardinen laichen hauptsächlich von September bis Februar (Bianchi et al., 1999).

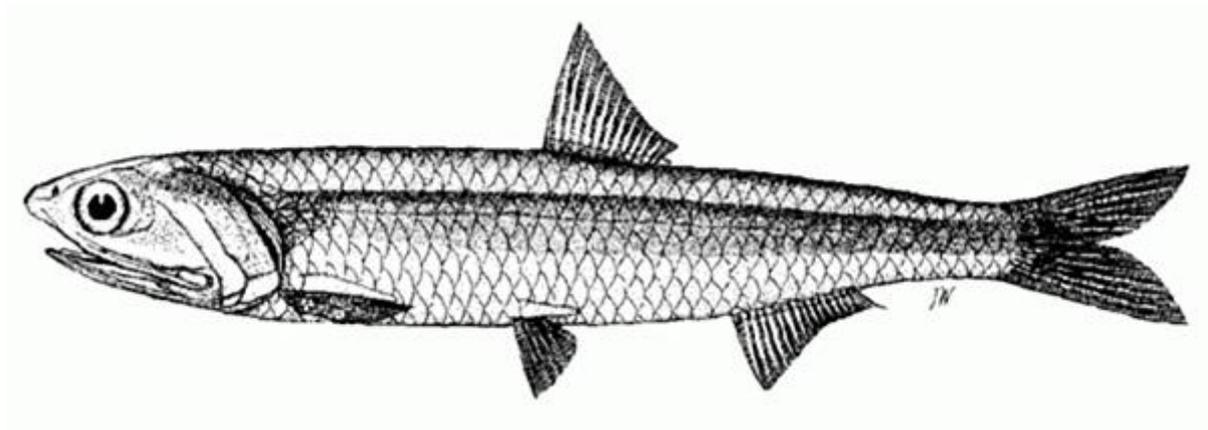


Fig 3: Südafrikanische Sardelle. (FAO Species catalogue Vol. 7. Clupeoid fishes of the world. Suborder CLUPEOIDEI), Quelle: <http://www.fao.org/fishery/species/2919/en>

Südafrikanische Sardelle (*Engraulis capensis*, ANC)

Die Südafrikanische Sardelle (ANC), *Engraulis capensis*, gehört zur Gattung *Engraulis* innerhalb der Familie der *Engraulidae* (Heringsartige). Diese Art bildet große Schwärme, lebt pelagisch in flachen Küstengewässern, kommt allerdings auch bis zu einer Tiefe von 200m (450m) vor. Laichzeit ist von Oktober bis November (vor Namibia vor allem im Februar), die Laichgründe befinden sich in südafrikanischen Küstengewässern, nicht weiter als 80km offshore. Die Eier sind ellipsenförmig. Die Südafrikanische Sardelle erreicht eine maximale Länge von 17 cm. Juvenile ernähren sich von Zooplankton (hauptsächlich calanoide Copepoden), ab einer Länge von etwa 5cm besteht die Ernährung sowohl aus Zooplankton als auch aus Phytoplankton. Sardellen werden mit Beutelnetzen gefangen und spielen eine wichtige Rolle in der Fischerei-Industrie, da sie zu Fischöl und Fischmehl weiterverarbeitet werden (Bianchi et al., 1999)

2.3 Auswahl der Proben

Die hier verwendeten Proben wurden nicht selbst genommen, sondern stammen von unterschiedlichen Ausfahrten (Tab 2) im Rahmen des internationalen GENUS-Projektes (**G**eochemistry and **E**cology of the **N**amibian **U**pwelling **S**ystem). Dieses Projekt versucht die Beziehung zwischen Klimawandel, biogeochemischen Stoffkreisläufen sowie

Ökosystemstrukturen am Beispiel des Nördlichen Benguela Auftriebsgebiets zu klären. Die Auswahl der Proben erfolgte sowohl bei ANC als auch bei SAR nach Stationen. Hier wurden nördliche und südliche Stationen aus dem nördlichen Benguela-Auftriebsgebiet ausgewählt. Die südlichen Stationen befanden sich in flacheren Gewässern als die nördlichen, d.h. von hier stammende SAR-Proben waren mit größerer Wahrscheinlichkeit hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt. Da innerhalb einer Station häufig nicht genügend Exemplare zur Verfügung standen, wurden Proben aus mehreren, nah beieinander liegenden Stationen mit sehr ähnlichen Parametern ausgesucht. In den südlichen Stationen wurde zu wenige Sardellen gefangen um aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen, daher wurden nur Exemplare aus den nördlichen Stationen verwendet (siehe Tab 1). Als weiteres Kriterium wurden Juvenile ab einer Länge von 11mm (SAR) und 15mm (ANC) ausgewählt, um eine optimale Enzymextraktion und –analyse möglich zu machen. Kleinere oder sehr leichte Exemplare wurden mit anderen aus derselben Station „gepooled“ um einen ausreichend hoch konzentrierten Extrakt herstellen zu können.

Tab 1: Übersicht über die beprobten Stationen von SAR und ANC. South/East dez = Lage der Station in Dezimalgrad, depth intervall net = Fangtiefe, T/DO at net = Temperatur und gelöster Sauerstoff in der Fangtiefe

Art	Lage	Ausfahrt	South (dez)	East (dez)	Station	Proben (n)	total depth (m)	Netzart	depth intervall net (m)	T at net (°C)	DO at net (ml/l)
ANC	N	MSM 17/3	-17.25	11.72	304	3		TT3	19-0	18.072	2.539
		MSM 7/2	-17.26	11.292	13	5		10m2MOC N1	100-0	16.421	1.488
SAR	N	MSM 17/3	-23	14.05	224	1	139	TT-2	70-0	14.92	
		MSM 7/3	-18.26	11.87	103	2	42	Tuccer	40-0	18.4	2.715
		MSM 7/3	-16.75	11.67	112	2	31	Ring	30-0		
	S	MSM 17/3			260	5		MNo4			
		MSM 17/3	155	-23	254	5	14	MNo4			

Tab 2: Überblick über die GENUS Ausfahrten von denen Proben für diese Arbeit verwendet wurden

Jahr	Monat	Ausfahrt	Forschungsschiff
2011	Februar	MSM 17/3	<i>RV Maria S. Merian</i>
2008	Februar	MSM 7/2	<i>RV Maria S. Merian</i>
2008	März	MSM 7/3	<i>RV Maria S. Merian</i>
2008	März	MSM 7/3	<i>RV Maria S. Merian</i>

3 Methoden

3.1 Messung der metabolischen Schlüsselenzyme

Die Fischlarven für die Enzymmessung wurden bei -80°C im Zentrum für Marine Tropenökologie (ZMT) aufbewahrt. Während der gesamten Extraktion und Messung der Enzymaktivitäten wurden die Proben/Extrakte auf Eis behandelt und gelagert. Die Muskelgewebe wurden nach einem gleichbleibenden Schema extrahiert und mit für das jeweilige Enzym spezifischen Puffern behandelt. Die meisten der verwendeten Lösungen wurden im Vorfeld hergestellt. Ausgenommen waren Acetyl-CoA und LDH, die jeweils am Tag der Messung frisch angesetzt wurden. Die Puffer zur Homogenisierung und für die Messung des jeweiligen Enzymes wurden bei 2°C gelagert, die Substrat-Lösungen wurden direkt nach der Herstellung bei -20°C eingefroren.

Die Abnahme (CS) und Zunahme (PK, LDH) der Absorption wurde mit einem auf 18°C (entspricht der Temperatur der Fangtiefe) gekühltem Photometer (PerkinElmer, Lambda 35, UV/VIS spectrometer) ermittelt. Bei den Leerproben (Blanks) wurde anstelle des Probenextraktes die gleiche Menge Homogenisations-Puffer hinzugefügt. Die Messung ging über 5 min, in Intervallen von 15 s. Nachträglich wurde mithilfe der Software UV WinLab die Zeitspanne so eingestellt, dass nur die lineare Beziehung berücksichtigt wurde (hauptsächlich zwischen 30 s und 270 s oder zwischen 60 s und 240 s). Mit der so ermittelten Steigung wurde nach Abzug der Blanks die Aktivität der Enzyme berechnet.

3.2 Präparation

Die Präparation des Muskelgewebes erfolgte bei allen Proben nach demselben Schema. Während der gesamten Präparation wurden die Proben auf Eis behandelt und gelagert, um die Funktion der Enzyme zu erhalten. Die bei -80°C gefrorenen Larven wurden auf eine mit Eis gefüllte Petrischale gelegt. Unter dem Binokular wurde, bis auf 0,5 mm genau, die Standardlänge ermittelt. Der Mageninhalt wurde entfernt, in eine Skala von 0 (leer) bis 10 (voll) eingeordnet und das Gewicht (guttet wet mass, WM_g) bestimmt. Der Kopf wurde entfernt, die Probe in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Muskelgewicht (WM_m) mit einer Feinwaage (Sartorius AG, $d = 0,001 \text{ mg}$) ermittelt. Bei kleineren Larven wurden mehrere Exemplare aus einer Station wie oben

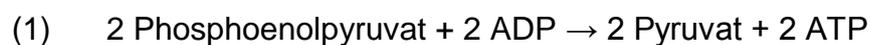
beschrieben behandelt, zusätzlich wurde am Schluss das Muskelgewicht aller Proben zusammen ermittelt.

3.2.1 Herstellung des Extraktes

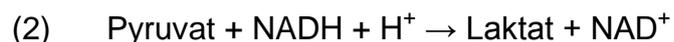
Die Extrakte für Pyruvat-Kinase, Laktat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase wurden im Verhältnis 1:50 (Gewicht: Volumen) mit auf 18°C gekühltem Homogenisations-Puffer (75 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) vorbereitet und für mindestens 1 Minute (bei größeren Larven auch länger) per Hand mit einem Plastikstößel homogenisiert. Daraufhin wurden sie eine weitere Minute mit Ultraschall behandelt (Bandelin, Sonopuls homogenisator; Amplitude: 20%, pulse on: 0,1 s, pulse off: 1,0 s). Die Zentrifuge (Eppendorf, 5804R) wurde auf 2 °C vorgekühlt und die Proben für 10 Minuten bei 2 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gelagert.

3.2.2 Pyruvat-Kinase (PK) Aktivität

Das Enzym Pyruvat-Kinase katalysiert den letzten Schritt der aeroben glykolytischen Reaktionsabfolge. Es überträgt eine Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat auf ADP, wodurch ATP und Pyruvat entsteht. Letzteres tritt dann in den Citrat-Zyklus ein (1) und gilt als Indikator für glykolytische Aktivität.



In Anwesenheit von LDH wird NAD^+ gebildet (2).



Mithilfe eines Spektrophotometers kann der Verbrauch von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,31 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) festgestellt werden. Die PK-Aktivität ist proportional zur aufgezeichneten Abnahme der Absorption. Die Aktivität der Pyruvat-Kinase wurde nach Hickey und Clements (2003) ermittelt, mit Modifikationen für ANC und SAR (Volumina siehe Tab 3). Der Assay Puffer (bestehend aus 60 mM Tris, 60 mM KCl und 6 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, pH 7,6) wurde in einer 1 ml Küvette mit Nikotinamid-

Adenin-Dinukleotid (NADH, 5mM), Phosphoenolpyruvat (PEP, 50 mM), Laktat-Dehydrogenase (LDH, 5,5 U/10 µl, aus Kaninchenmuskel), dem Probenextrakt und destilliertem Wasser in den angegebenen Mengen mithilfe eines Plastikrührers gut vermischt. Das Reaktionsgemisch wurde im Thermomixer bei 18 °C für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Adenosin-Diphosphat (ADP, 100 mM) gestartet und die Abnahme der Absorption über 5 Minuten gemessen.

Tab 3: Volumina der einzelnen Reaktionsgemische zur Messung der PK-Aktivität bei SAR und ANC

ANC	SAR
828 µl Assay Puffer	828 µl Assay Puffer
50 µl NADH	50 µl NADH
10 µl PEP	10 µl PEP
2 µl LDH	2 µl LDH
5 µl Extrakt	16 µl Extrakt
90 µl Aqua dest.	79 µl Aqua dest
15 µl ADP	15 µl ADP

3.2.3 Laktat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität

Bei Abwesenheit von Sauerstoff (anaerobe Glykolyse) entstehen aus anaerober Oxidation zwei Moleküle Laktat (siehe 3.2.2 (2)).

Dieser Schritt wird katalysiert durch das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH). Darüber hinaus erfüllt die Reduktion des Pyruvats die Funktion der Oxidation von NADH, welches während der aeroben Glykolyse gebildet wurde, zurück zum NAD⁺. Die Mengen der jeweiligen Reaktionsteilnehmer unterschieden sich bei ANC und SAR und wurden somit spezifisch auf die jeweilige Fischart eingestellt (Tab 4) um maximale Enzymaktivitäten zu erhalten. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches erfolgte nach Lushak *et al.* (2001) mit Modifikationen. Zum Assay Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8) wurde NADH (10 mM), das Probenextrakt und destilliertes Wasser hinzu pipettiert und mit einem Plastikrührer gut gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation im Thermomixer wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumpyruvat (Na-Pyr, 250 mM) gestartet.

Bei einer Wellenlänge von 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,31 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde die Abnahme der Absorption über 5 min gemessen.

Tab 4: Volumina der einzelnen Reaktionsgemische zur Messung der LDH-Aktivität bei ANC und SAR

ANC	SAR
500 μl Assay Puffer	828 μl Assay Puffer
15 μl NADH	50 μl NADH
4 μl Extrakt	9 μl Extrakt
477 μl Aqua dest.	472 μl Aqua dest
4 μl Na-Pyr	4 μl Na-Pyr

3.2.4 Citrat-Synthase (CS) Aktivität

Die Citrat-Synthase ist ein Schüsselenzym des mitochondrialen aeroben Stoffwechsels. Sie katalysiert die einleitende Reaktion des Citrat-Zyklus zwischen dem Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und dem Oxalacetat zu Citrat und Coenzym A (3).



Durch Zugabe von DTNB (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure) wird die Enzymaktivität messbar. Es bildet nach einer irreversiblen Reaktion mit CoA-SH einen gelben Komplex (4). Die Produktion des Komplexes lässt sich bei 412 nm ($\epsilon_{\text{DTNA}} = 13,61 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) messen und führt zu einem linearen Anstieg der Absorption, proportional zu der enzymatischen Aktivität der Citrat-Synthase. Diese wurde nach Sidell *et al.* (1987) bestimmt mit folgenden Modifikationen: Zu 750 μl Tris/HCl Puffer (100 mM, pH 8,2) wurden 50 μl DTNB (5 mM), 10 μl Acetyl-Coenzym-A (Ac-CoA, 20 mM), 30 μl Probenextrakt und 150 μl destilliertes Wasser hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Die Zugabe von 10 μl Oxalacetat (20 mM) startete die Reaktion.

3.2.5 Berechnung der Enzymaktivität

Die errechnete Enzymaktivität bezieht sich auf das Muskelgewicht und wurde dementsprechend in Units pro Gramm Muskelgewicht ($\text{U g}^{-1} \text{WM}_m$) ausgedrückt. Wobei eine Unit einem μmol Substratumsatz pro Minute entspricht. Der Berechnung liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zu Grunde (5), welches den Zusammenhang der Absorption von Licht und der Konzentration eines absorbierenden Inhaltsstoffes in einer Flüssigkeit beschreibt:

$$(5) \quad A = \epsilon \times c \times d$$

$$c = \frac{A}{\epsilon \times d} \quad \leftrightarrow \quad \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A / \Delta t}{\epsilon \times d}$$

$\Delta A / \Delta t$ = Änderung der Absorption über die Zeit
 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
 d = Schichtdicke der Küvette (1cm)

Die während der Präparation und Extraktion vorgenommenen Verdünnungen wurden als Verdünnungsfaktoren (DF_1 , DF_2) in der Berechnung berücksichtigt, um die Aktivität auf ein Gramm Muskelgewebe beziehen zu können.

$$DF_1 = \frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Extrakt}}} \quad DF_2 = \frac{V_{\text{HOM}}}{m_{\text{Probe}}}$$

V_{gesamt} = Endvolumen in der Küvette (1ml)
 V_{Extrakt} = im Reaktionsgemisch verwendetes Volumen des Homogenats [μl]
 V_{HOM} = Volumen des Homogenisationspuffers zur Homogenisierung [μl]
 M_{Probe} = Feuchtgewicht (WM_m) des Muskelgewebes [g]

$$(6) \quad \text{Enzymaktivität [U g}^{-1} \text{WM]} = \frac{\Delta A / \text{min}}{\epsilon \times d} * DF_1 * DF_2$$

3.3 Einstellen der Methode

Die Methode zur Messung der Enzymaktivitäten von PK, LDH und CS wurden während eines „student research project“ für die Kap-Bastardmakrele optimiert (Michalek, 2012) und hier an die Messung der Südafrikanischen Sardine und der Südafrikanischen Sardelle angepasst. Dazu wurden unterschiedliche Substratvolumina sowie die optimale Menge an Probenextrakt getestet, um eine lineare Absorptionsänderung und eine maximale Aktivität zu ermöglichen.

3.4 Datenanalyse und Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem Programm SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc; San Jose, USA) durchgeführt. Der Vergleich mehrerer Datengruppen wurde mit der Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, wenn eine Normalverteilung der Proben und gleiche Varianz gegeben waren. Nicht normal-verteilte Daten wurden mit der nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Rang-Varianzanalyse gefolgt von unterschiedlichen post-hoc Analysen behandelt. Die Daten wurden ab einem Signifikanzlevel von $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich eingestuft.

Zur Analyse der Beziehung zwischen der Enzymaktivität und der Körpermasse wurden die Rohdaten \ln -transformiert, um eine geeignete Korrelation zu erhalten. Es wurde eine einfache lineare Regressionsanalyse angewandt und die allometrische Relation angegeben: $Enzymaktivität = b * WM^a$, welche die Integrationskonstante b und den metabolischen Koeffizienten a beinhaltet. Die Daten wurden im doppelt logarithmischen Koordinatensystem für jedes Enzym dargestellt, inklusive der Regressionsgerade. Die Werte für allometrische Koeffizienten (a und b) sowie den Korrelationskoeffizienten (r^2) und das Signifikanzlevel (p -Wert) wurden für jede Beziehung angegeben (Tab 7).

Um einen Eindruck von der Kondition der juvenilen Sardinen und Sardellen zu bekommen, wurde der Konditionsfaktor K mit $K = \text{Gewicht}/\text{Länge}^a$ berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Proben von PK, LDH und CS

Extraktmenge

Alle im Folgenden getesteten Veränderungen der Extraktmengen wurden bei einer Verdünnung von 1:50 (w:v) durchgeführt. Es wurde allein die Menge des zugegebenen Probenextraktes verändert. Die Volumina der einzelnen Reaktionsteilnehmer entsprachen der Einstellung zur Messung der Enzymaktivität von *Trachurus trachurus capensis* (HMC) und blieben konstant.

- **PK:** Für die Bestimmung der PK-Aktivität wurden für SAR Extraktmengen von 14µl, 15µl und 16µl getestet. Bei einer Zugabe von 16 µl des Probenextraktes wurde die höchste Steigung gemessen. Diese Menge wurde für alle weiteren SAR-Proben verwendet (Tab 5).

Bei ANC wurden Messungen mit 5 µl, 10 µl und 12 µl Extraktmenge durchgeführt. Bei höherer Enzymkonzentration im Reaktionsgemisch war eine leicht hyperbelförmige Abnahme der Absorption zu erkennen. Bei einer Zugabe von 5 µl Extrakt war die Steigung linear und es wurde die höchste Aktivität errechnet (Tab 5).

Tab 5: Einfluss unterschiedlicher Extraktmengen auf die PK-Aktivität bei SAR und ANC, angegeben in %

SAR	V _{Extrakt} [µl]	PK _A [%]
	14	86,69
	15	93,03
	16	100,00

ANC	V _{Extrakt} [µl]	PK _A [%]
	12	37,23
	10	68,17
	5	100,00

- **LDH:** Von den gemessenen Extraktmengen (8 µl, 9 µl, 10 µl) zeigte eine Zugabe von 9 µl SAR-Extrakt zwar nicht die höchste Aktivität, wurde jedoch für die weiteren Messungen verwendet da 8 µl und 9 µl keine lineare Absorptionsänderung zeigten, sondern leicht hyperbelförmig waren (Tab 6).

Ähnlich verhielt es sich bei den ANC-Proben. Eine Zugabe von 3 µl und 5 µl führte zwar zu einer hohen Aktivität, allerdings zeigte sich nur bei einer Zugabe von 5 µl Probenextrakt eine lineare Absorptionsänderung. Sowohl bei 3 µl als auch bei 5 µl war erst ein steiler Abfall der Absorption zu sehen, diese flachte dann jedoch ab, was zu einer deut-

lich hyperbelförmigen Abnahme führte. Für alle weiteren Messungen wurde dementsprechend mit 4 µl Probenextrakt gemessen (Tab 6).

Tab 6: Einfluss unterschiedlicher Extraktmengen auf die LDH-Aktivität bei SAR und ANC, angegeben in %

SAR	V _{Extrakt} [µl]	LDH _A [%]
	8	100
	10	99,83
	9	96,83

ANC	V _{Extrakt} [µl]	LDH _A [%]
	3	100
	5	96,84
	4	50,66

- CS: Sowohl bei SAR als auch bei ANC war bei einer Extraktzugabe von 30µl ein linearer Abfall der Absorption und die höchste Aktivität gemessen worden.

Substratmenge

- PK: Eine Erhöhung der Substratmenge von 10µl auf 15µl ADP hatte sowohl bei ANC als auch bei SAR zur Folge, dass die Absorption gleichmäßiger abnahm und die Aktivität höher war (Fig 4, a). Die Zugabe von 4µl LDH statt 2µl LDH verursachte hingegen eine ungleichmäßige Abnahme, erkennbar durch einen welligen Verlauf der Absorptionsänderung (Fig 4, b). Ebensolche Auswirkungen (Fig 5, d) hatte eine Erhöhung der Zugabe von NADH (von 50µl auf 55µl). Eine erhöhte Zugabe aller Reaktionsteilnehmer hatte einen welligen Verlauf der Absorptionsänderung zur Folge (Fig 5, e). Da eine Zugabe von 15µl ADP das beste Ergebnis in Form von einer linearen Abnahme der Absorption lieferte, wurde für das Messen der PK-Aktivität bei SAR und ANC eine Substratmenge von 15µl ADP zu jeder Probe hinzugefügt.
- LDH: Bei SAR lieferte die Zugabe von 6µl statt 4µl Na-Pyruvat sowohl eine lineare Abnahme der Absorption (Fig 7) als auch eine höhere Steigung, sodass weitere Einstellungen nicht mehr vorgenommen werden mussten. Bei der Messung der LDH-Aktivität aus ANC wurden keine Modifikationen vorgenommen, da eine Erhöhung der Substratmenge eine leicht hyperbelförmige statt lineare Abnahme der Absorption zu Folge hatte. So wurden alle ANC-Proben mit einer Substratmenge von 4µl Na-Pyruvat als Reaktionsstarter behandelt.
- CS: Die Voreinstellungen mussten nicht verändert werden, da bereits bei einer Extraktmenge von 30µl ein linearer Anstieg der Absorption zu erkennen war.

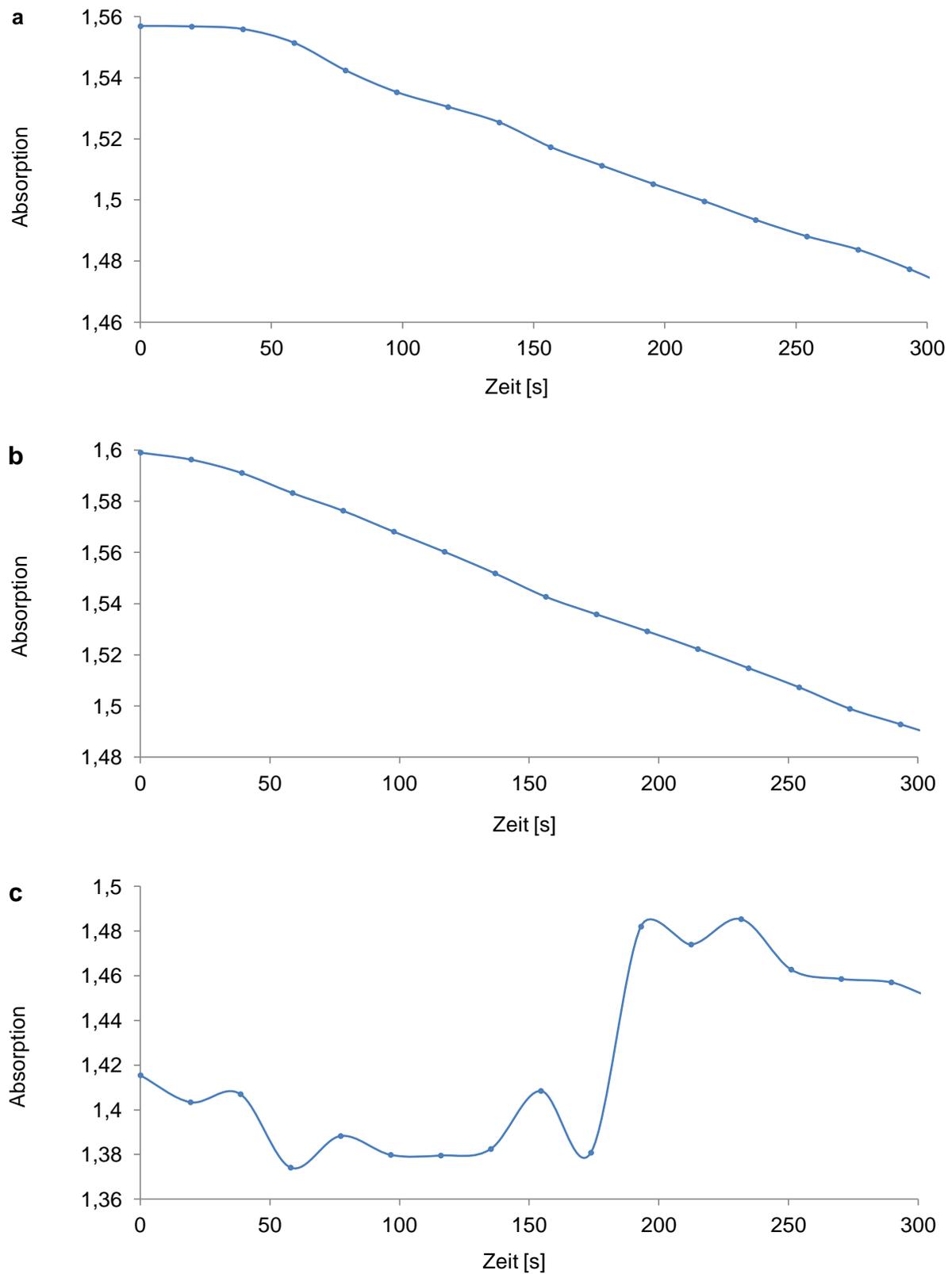


Fig 4: Verlauf der Absorptionsänderung bei PK aus SAR nach Erhöhung der Zugabe um

- a) 2 μ l LDH;
- b) 5 μ l ADP und
- c) 5 μ l ADP + 2 μ l LDH

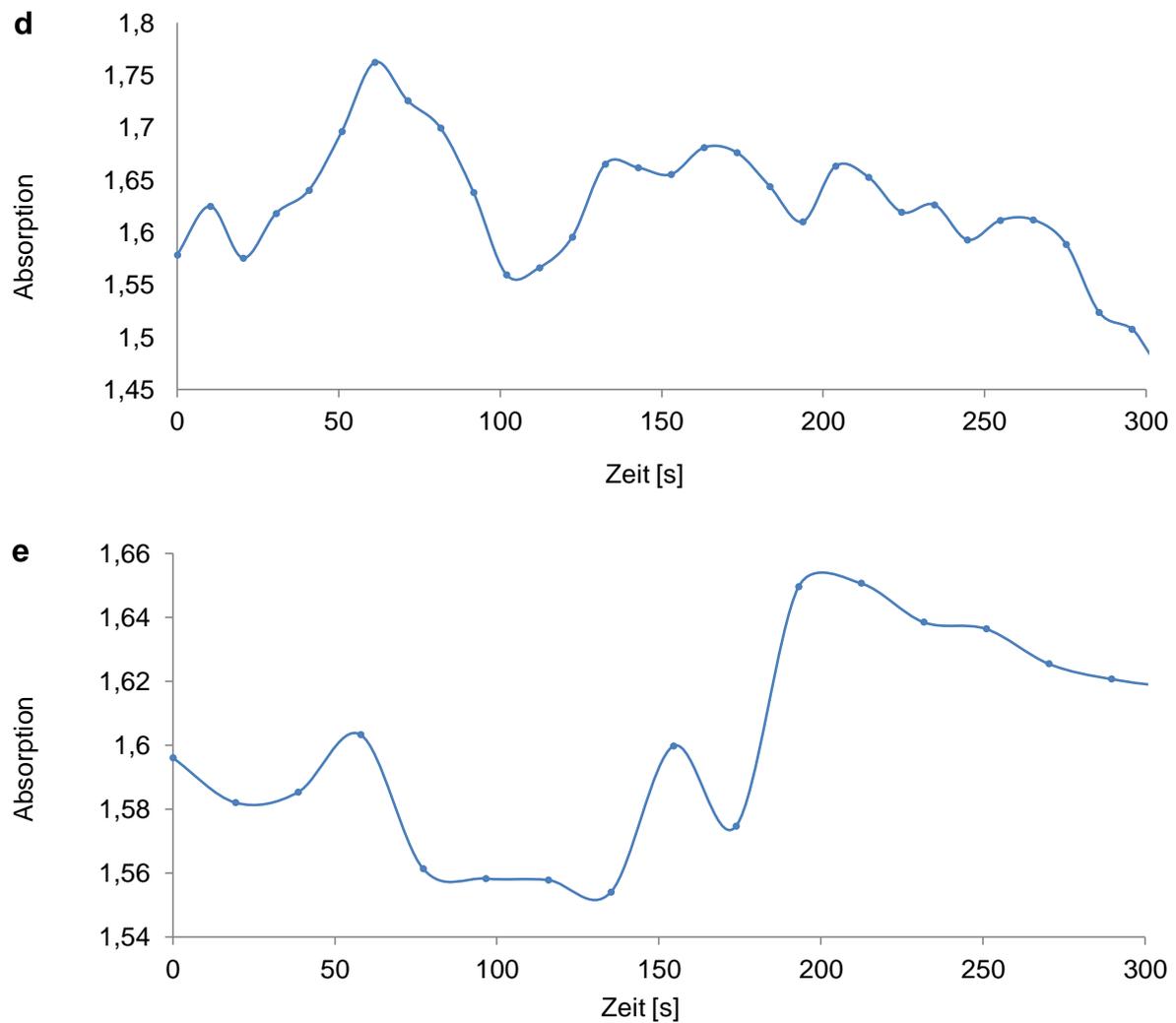


Fig 5: Verlauf der Absorptionsänderung bei PK aus SAR nach einer Erhöhung der Zugabe um
d) 5 μ l ADP + 5 μ l NADH und
e) 5 μ l ADP + 2 μ l LDH + 5 μ l NADH

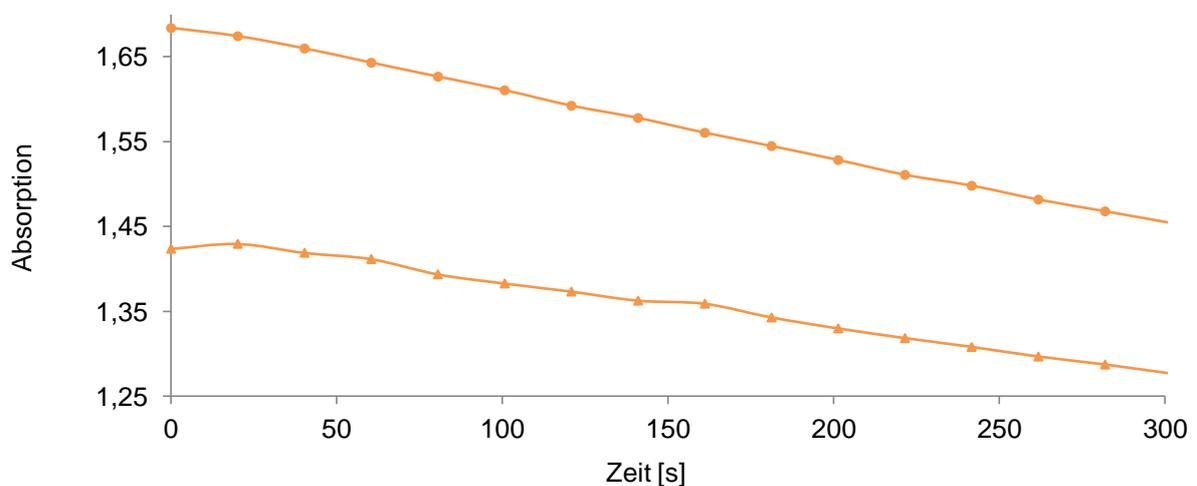


Fig 6: Verlauf der Absorptionsänderung bei PK aus ANC nach der Zugabe von 10 μ l ADP (Dreiecke) und 15 μ l ADP (Punkte)

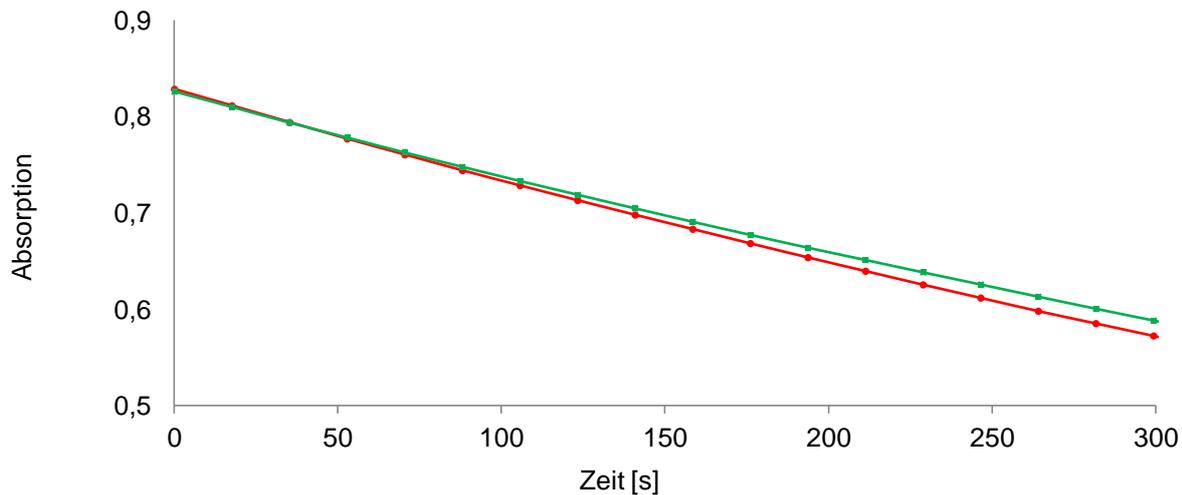


Fig 7: Absorptionsänderung bei LDH aus SAR nach der Zugabe von 4µl Na-Pyruvat (rot) und 6µl Na-Pyruvat (grün)

4.2 Aktivität der Stoffwechsellenzyme

Die Aktivitäten von PK, LDH und CS wurden an 15 unbehandelten juvenilen Sardinen und Sardellen gemessen, um Basisdaten der Enzymkapazität dieser Arten zu erhalten. Die Probenanzahl der jeweiligen Enzyme variiert, da nicht jedes Individuum ausreichend Probenmaterial für alle Messungen lieferte. Die Größe der analysierten Fische lag bei SAR zwischen 11 mm Standardlänge und 2 mg wet mass (WM) und 20 mm Standardlänge und 20 mg wet mass (WM_m). Bei den analysierten ANC-Proben lag die Größe der Fische zwischen 15mm Standardlänge und 9 mg Gewicht (wet mass, WM_m) und 28 mm Standardlänge und 75 mg Gewicht (wet mass, WM_m).

4.2.1 Intraspezifischer Vergleich

Bei SAR lagen die Mittelwerte der Enzymaktivitäten aus den südlichen Stationen bei allen drei Enzymen (PK, LDH, CS) deutlich unter den Mittelwerten der Aktivitäten aus den nördlichen Stationen. Die CS-Aktivität war bei SAR sehr niedrig. In den nördlichen Stationen lag der Mittelwert bei $12,26 \pm 2,56 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$, in den südlichen Stationen bei $7,90 \pm 3,01 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$ und unterscheiden sich somit signifikant ($p = 0,007$; Holm-Sidak Methode ANOVA). Höher waren dagegen die bei SAR gemessenen Mittelwerte der PK-Aktivitäten von $27,76 \pm 10,99 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$ im Norden und $6,39 \pm 1,81 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$ im Süden.

Auch hier lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten der nördlichen und südlichen Stationen vor ($p= 0,013$; Holm-Sidak Methode ANOVA). Verglichen mit den PK- und CS-Aktivitäten waren die LDH-Aktivitäten am höchsten. In den nördlichen Stationen lag der Mittelwert bei $44,48 \pm 27,86 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$ und signifikant niedriger ($p= 0,004$, Dunns Methode ANOVA) war der Mittelwert in den südlichen Stationen mit $11,50 \pm 3,38 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$.

Der Mittelwert der gemessenen Enzymaktivitäten bei ANC war bei CS am niedrigsten mit $5,02 \pm 0,66 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$ und im Vergleich dazu bei PK ($51,62 \pm 12,05 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$) und LDH ($89,78 \pm 40,45 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$) deutlich höher.

4.2.2 Physiologische Parameter

Auswirkung der Körpermasse auf die Enzymaktivität

Die Enzymaktivitäten von PK, LDH und CS wurden ermittelt als Funktion des Frischgewichtes vom Muskelgewebe (WM_m) oder des Frischgewichtes der Fischlarve mit entferntem Magen („guttet“, WM_g) von juvenilen Sardinen und Sardellen (Fig 8-13, a-c). Bei den beprobten Sardinen aus allen Stationen sank die spezifische CS-Aktivität bei steigendem Gewicht des Muskelgewebes und der Körpermasse, während die PK-Aktivität aller Stationen stieg. Die spezifische LDH-Aktivität der nördlichen Stationen sank bei zunehmendem Muskelgewebe und Körpermasse der Sardinen, die Aktivität bei den südlichen Stationen jedoch stieg. Eine positive Beziehung zwischen PK-Aktivität und steigender Körpermasse war bei den nördlichen Sardinen zu erkennen ($a = 0,793$; Tab 7), bei steigendem Muskelgewicht war sie jedoch schwächer ($a = 0,622$). Umgekehrt war es bei den südlichen Sardinen, wo ein höherer Exponent bei steigendem Muskelgewicht ($a = 0,764$) vorlag, in Bezug auf das Körpergewicht ($a = 0,081$) aber kein sichtbarer Zusammenhang deutlich wurde, erkennbar durch einen Exponent nahe null. Die LDH-Aktivität der nördlichen Sardinen wies eine deutlich negative Beziehung zu steigendem Muskelgewicht ($a = -0,893$) und noch deutlicher bei steigendem Körpergewicht ($a = -0,933$) auf, worauf auch eine starke lineare Beziehung hinweist (WM_m : $r^2 = 0,728$; WM_g : $r^2 = 0,769$; Tab 7). Schwächer waren die Werte der südlichen LDH-Aktivitäten bezogen auf das Muskelgewicht ($a = 0,386$) und das Körpergewicht ($a = 0,485$). Eine Beziehung zwischen der spezifischen CS-Aktivität und zunehmendem Ge-

wicht von Körper und Muskelgewebe wurde nur bei den südlichen Sardinien gefunden. Sowohl bei steigendem Muskelgewicht ($a = -0,666$) als auch bei steigender Körpergewicht ($a = -0,727$) sank die spezifische Citrat-Synthase-Aktivität. Die Exponenten der nördlichen Stationen mit $a = -1,58$ bei steigendem Muskelgewicht und $a = -0,279$ bei steigendem Körpergewicht waren deutlich niedriger.

Die spezifische PK-Aktivität der nördlichen Sardellen wies eine negative Beziehung zu steigendem Muskelgewicht auf ($a = -0,178$; Tab 7). In Bezug auf ein steigendes Körpergewicht zeigten allometrische Beziehung und Regressionsstatistik jedoch einen deutlichen negativen Zusammenhang mit $a = -1,175$ und $r^2 = 0,821$. Während die spezifische LDH-Aktivität bei steigendem Muskelgewicht anstieg ($a = 0,166$), sank sie bei steigendem Körpergewicht ($a = -0,541$). Während bei steigendem Muskelgewicht ($a = 0,088$) keine Abhängigkeit zur spezifischen CS-Aktivität sichtbar war, wurde bei steigendem Körpergewicht eine negative Beziehung ($a = -0,269$) gefunden.

Tab 7: Beziehung zwischen Körpermasse (WM_m : Frischgewicht des Muskelgewebes, und WM_g : Frischgewicht der Fischlarve mit entnommenem Magen) und der Enzymaktivitäten (PK, LDH und CS) von SAR und ANC, dargestellt als allometrische Beziehung. Angegeben sind die Koeffizienten, sowie Probenumfang (n) und Regressionsstatistik (r^2 und p-Wert). Signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen gekennzeichnet

SAR			Allometrie $Y = a * X^b$		Regression		
			exp b	a	r^2	p-Wert	
PK	Norden (n=5)	mWM	0,622	1,385	0,655	0,524	
		gWM	0,793	1,466	0,507	0,004 *	
	Süden (n=4)	mWM	0,764	- 0,078	0,747	0,010 *	
		gWM	0,081	1,409	0,045	0,029 *	
LDH	Norden (n=5)	mWM	- 0,893	6,231	0,728	0,171	
		gWM	- 0,933	6,329	0,769	0,677	
	Süden (n=4)	mWM	0,386	1,375	0,271	0,232	
		gWM	0,485	0,586	0,351	0,001 *	
CS	Norden (n=5)	mWM	- 0,158	2,985	0,241	0,048 *	
		gWM	- 0,279	3,136	0,500	0,041 *	
	Süden (n=4)	mWM	- 0,666	3,728	0,321	0,018 *	
		gWM	- 0,727	3,832	0,525	0,007 *	
ANC	PK	Norden (n=7)	mWM	- 0,178	4,494	0,048	< 0,001 *
		gWM	- 1,175	7,859	0,821	0,543	
LDH	Norden (n=12)	mWM	0,166	3,869	0,012	< 0,001 *	
		gWM	- 0,541	5,860	0,231	0,104	
CS	Norden (n=10)	mWM	0,088	0,976	0,011	< 0,001 *	
		gWM	- 0,269	2,204	0,203	< 0,001 *	

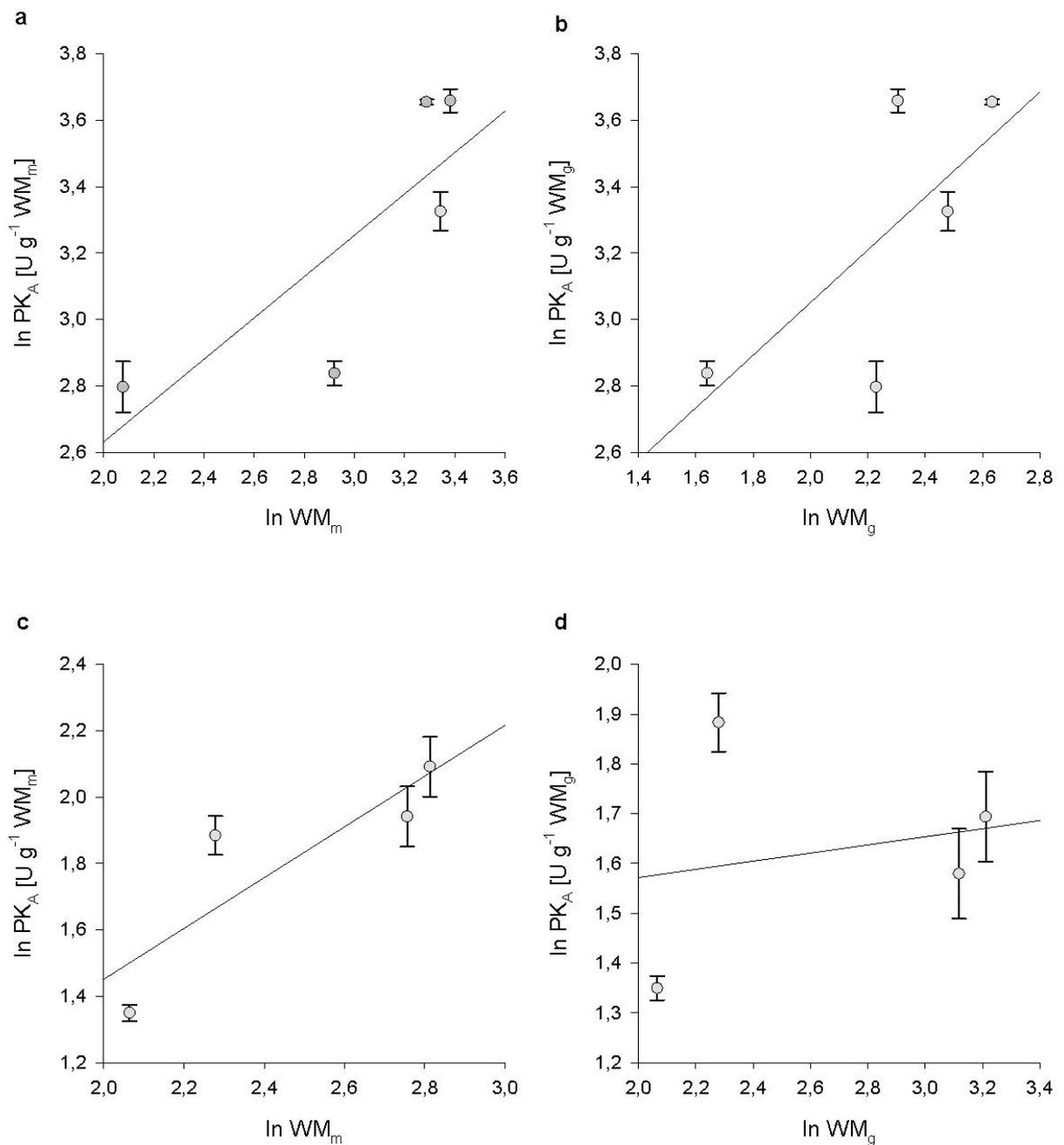


Fig 8: Beziehung zwischen spezifischer Pyruvat-Kinase Aktivität der Sardinen und dem Frischgewicht des Muskelgewebes (WM_m; a= Norden, c= Süden) sowie dem Frischgewicht der Fische ohne Magen (WM_g; a = Norden, d= Süden). Allometrische Koeffizienten und lineare Regression sind gegeben in Tab 7.

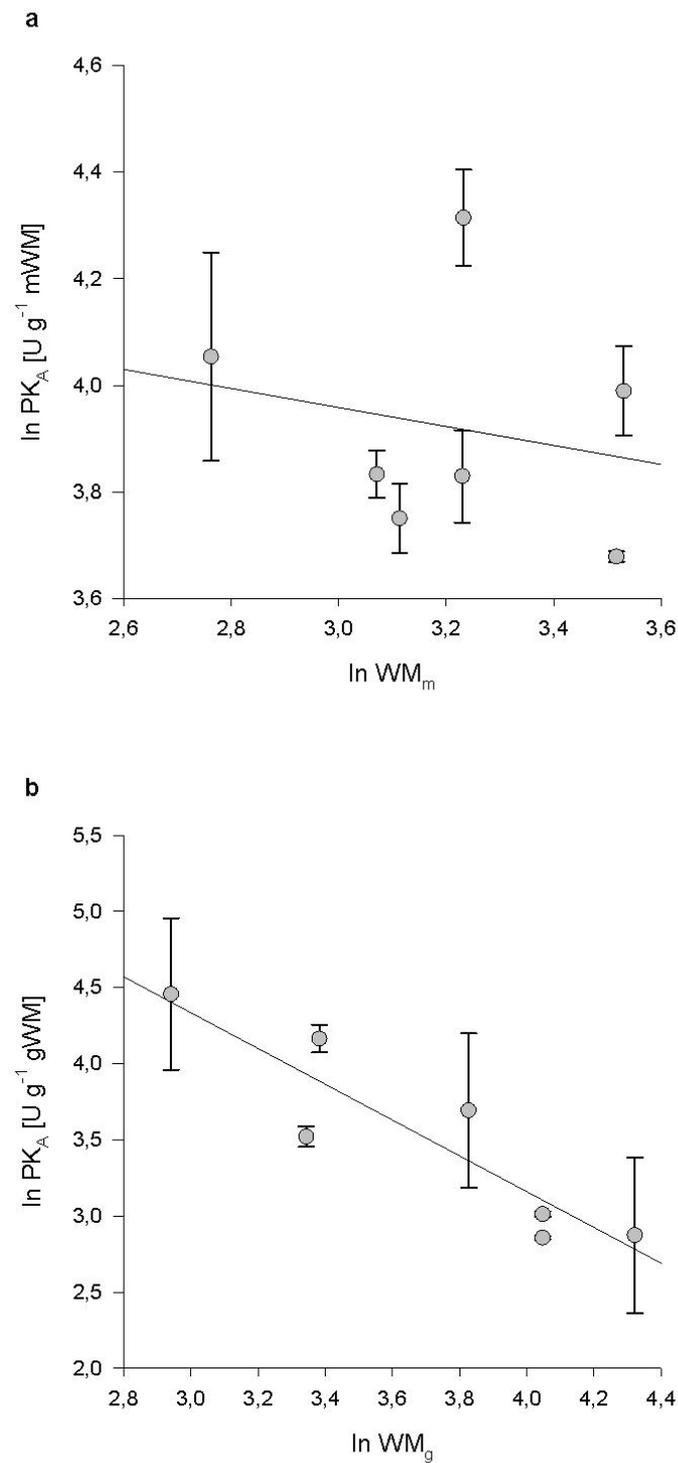


Fig 9: Beziehung zwischen spezifischer Pyruvat-Kinase Aktivität (PK_A) von Sardellen und dem Frischgewicht des Muskelgewebes (WM_m; **a**) sowie dem Frischgewicht des Fisches ohne Magen (WM_g; **b**). Allometrische Koeffizienten und lineare Regression sind in Tab 7 angegeben.

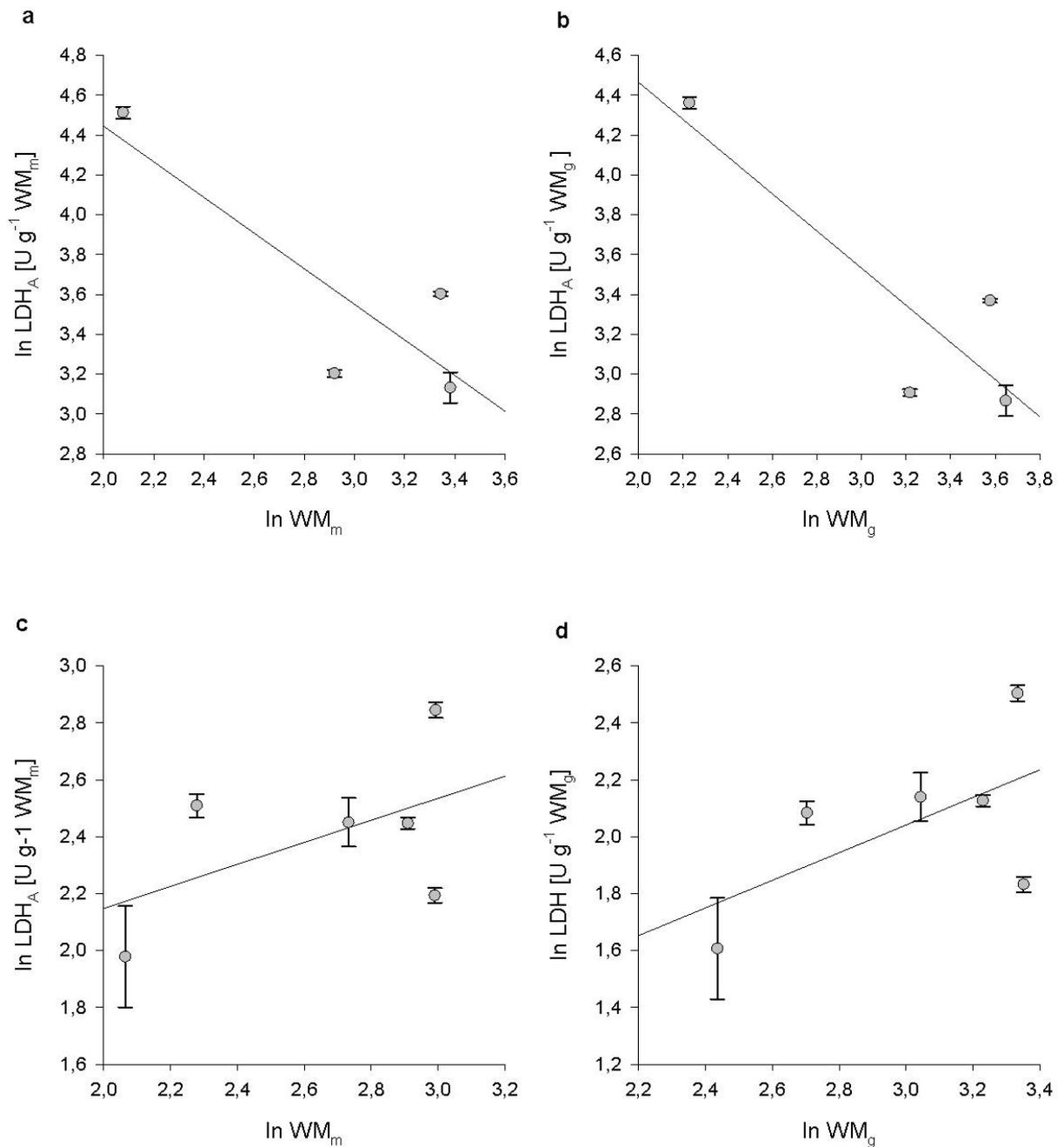


Fig 10: Beziehung zwischen spezifischer Laktat-Dehydrogenase Aktivität (LDH_A) der Sardinen und dem Frischgewicht des Muskelgewebes (WM_m; **a** = Norden, **c** = Süden) sowie dem Frischgewicht der Fische ohne Magen (WM_g; **a** = Norden, **d** = Süden). Allometrische Koeffizienten und lineare Regression sind gegeben in Tab 7.

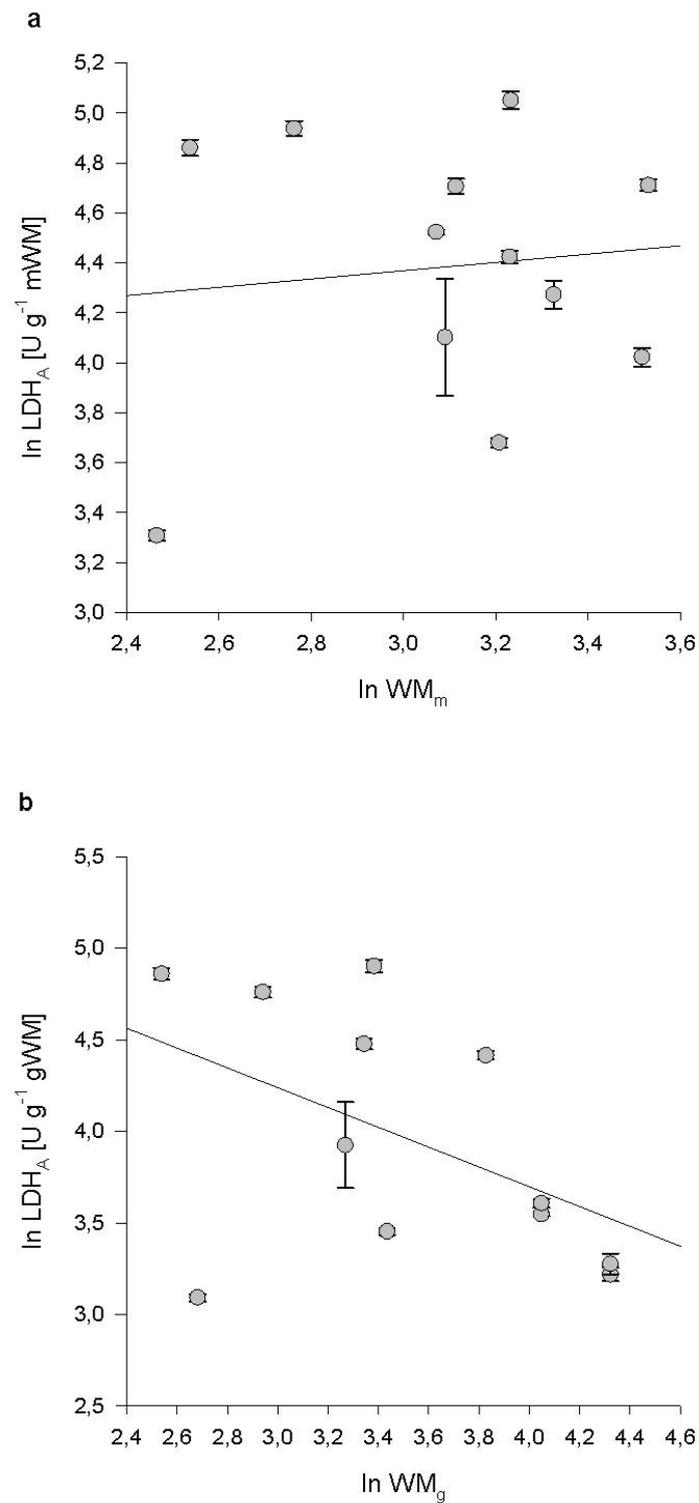


Fig 11: Beziehung zwischen spezifischer Laktat-Dehydrogenase Aktivität (LDH_A) von Sardellen und dem Frischgewicht des Muskelgewebes (WM_m; **a**) sowie dem Frischgewicht des Fisches ohne Magen (WM_g; **b**). Allometrische Koeffizienten und lineare Regression sind in Tab 7 angegeben.

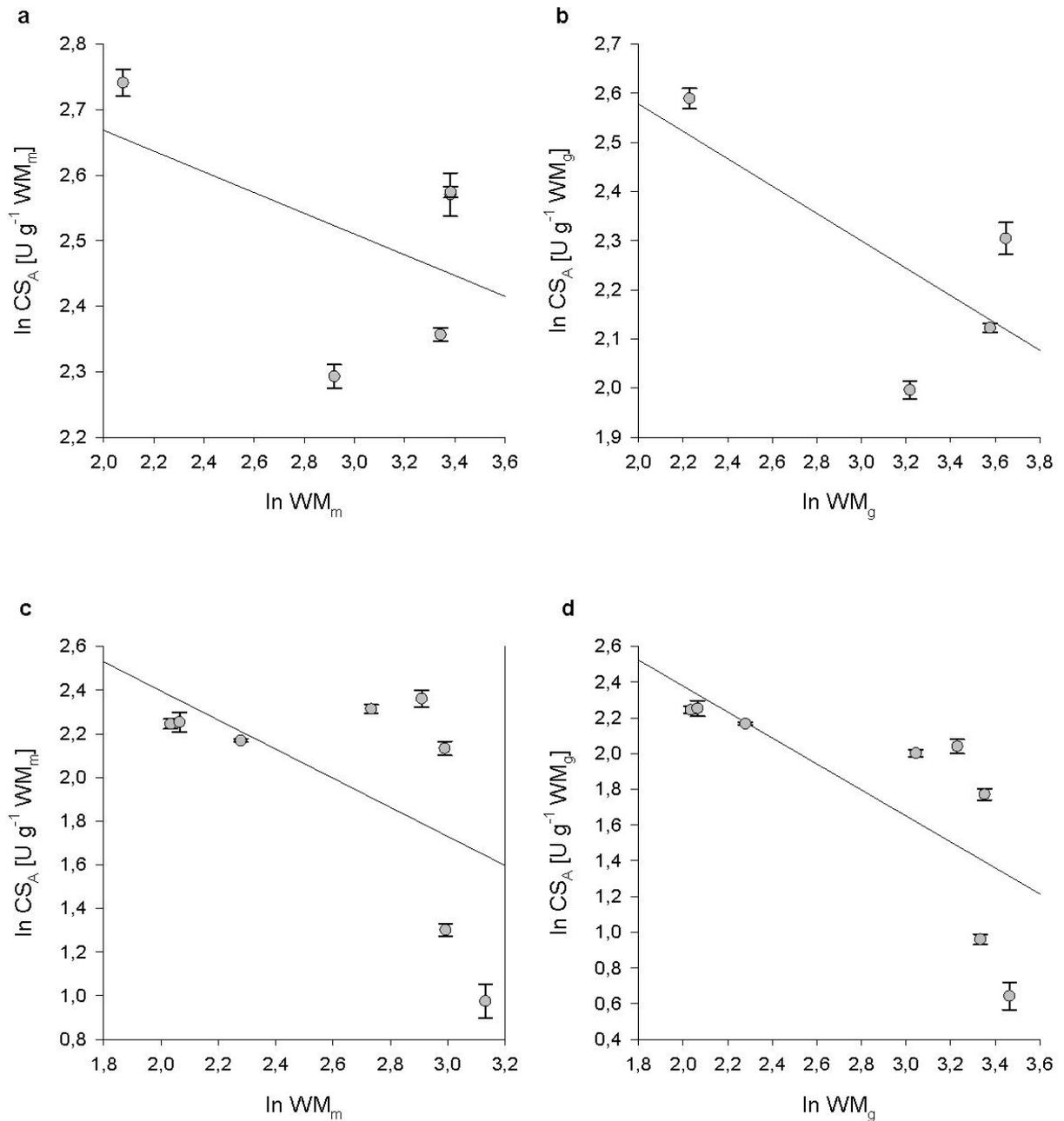


Fig 12: Beziehung zwischen spezifischer Citrat-Synthase Aktivität (CS_A) der Sardinen und dem Frischgewicht des Muskelgewebes (WM_m ; **a** = Norden, **c**= Süden) sowie dem Frischgewicht der Fische ohne Magen (WM_g ; **a** = Norden, **d**= Süden). Allometrische Koeffizienten und lineare Regression sind gegeben in Tab 7.

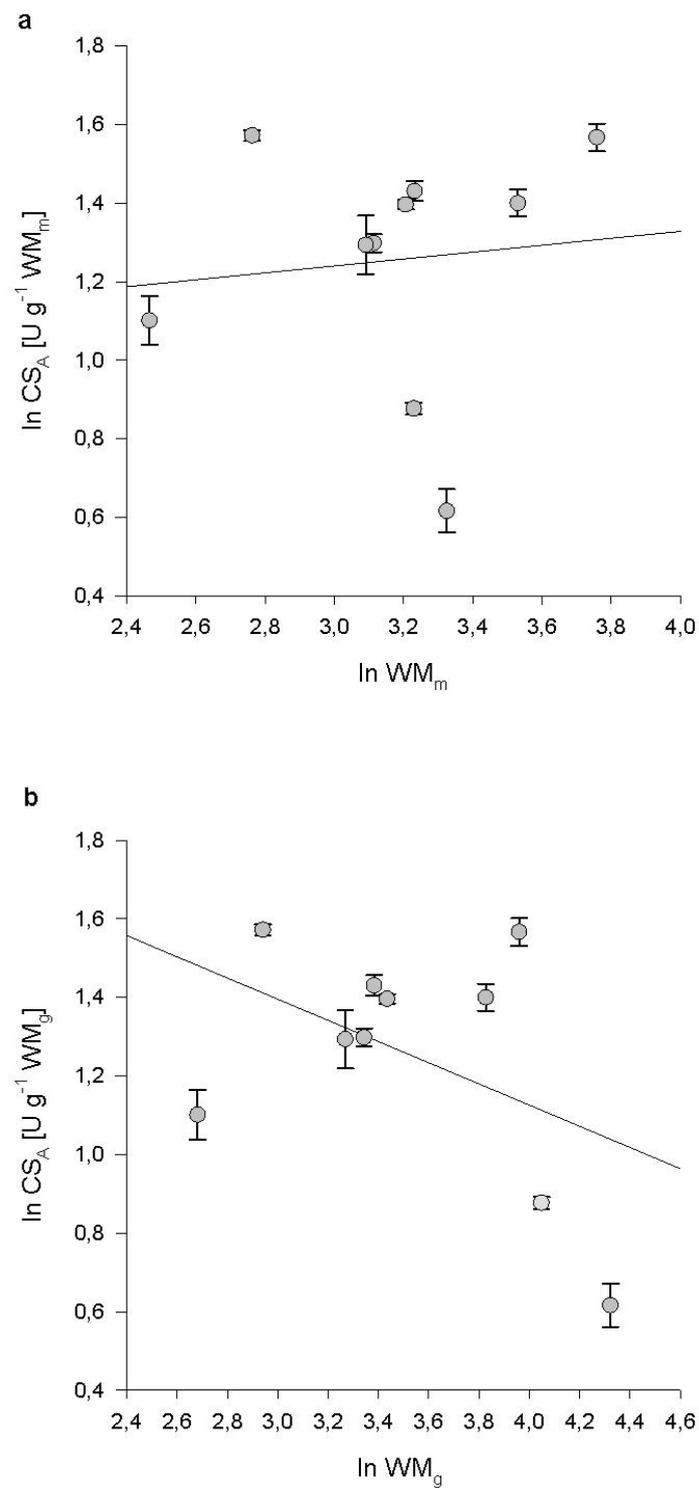


Fig 13: Beziehung zwischen spezifischer Citrat-Synthase Aktivität (CS_A) von Sardellen und dem Frischgewicht des Muskelgewebes (WM_m ; **a**) sowie dem Frischgewicht des Fisches ohne Magen (WM_g ; **b**). Allometrische Koeffizienten und lineare Regression sind in Tab 7 angegeben.

Konditionsfaktor

Bei gepoolten Proben wurde das mittlere Gewicht der Proben ohne Magen bestimmt und mit der Standardlänge für die Berechnung verwendet. Für Sardinen lag der Wert für den Exponenten a bei $a = 3,188$; für ANC bei $a = 3,108$ (Tab 8). Bei allen zur Messung der Enzymaktivität verwendeten Fischen war der Konditionsfaktor sehr niedrig (Tab 8). Der Mittelwert bei SAR aus den nördlichen Stationen betrug $0,14 \pm 0,021$ und bei SAR aus den südlichen Stationen $0,12 \pm 0,023$. Zwischen den Werten lag kein signifikanter Unterschied vor ($p > 0,05$; Dunns Methode, ANOVA). Der Mittelwert des Konditionsfaktors der ANC lag bei $0,24 \pm 0,054$ und war damit signifikant höher als der gemittelte Konditionsfaktor der nördlichen Sardinen ($p < 0,001$; Dunns Methode, ANOVA).

Tab 8: Konditionsfaktor (angegeben in Mittelwert \pm SD), Koeffizienten der Gewicht-Länge-Beziehung sowie Regressions-Statistik (r^2 und p-Wert), Probengröße (n). p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen SAR Norden und Süden, sowie den Vergleich zwischen ANC und SAR Norden.

		Konditionsfaktor	Gewicht-Länge-Beziehung		Regression	
		$K = (\text{Gewicht}/\text{Länge}^a) * 100$	$W = b * L^a$		r^2	p-Wert
		Mittelwert	a	b		
SAR	Norden (n= 5)	0,14 +/- 0,021	3,188	- 6,672	0,820	> 0,050
	Süden (n= 10)	0,12 +/- 0,023				
ANC	Norden (n= 13)	0,24 +/- 0,054	3,108	- 6,070	0,877	< 0,001

4.2.3 Interspezifischer Vergleich

Die Aktivitäten der Enzyme (PK, LDH, CS) von Südafrikanischen Sardinen (SAR) und Südafrikanischen Sardellen (ANC), jeweils aus den nördlichen Stationen, wurden miteinander verglichen. Bei allen drei Enzymen bestand ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Mittelwert der Aktivität zwischen Sardine und Sardelle (Fig 14-16). Am deutlichsten war das bei der mittleren LDH-Aktivität ($p < 0,001$; Dunns Methode, ANOVA) und bei der mittleren CS-Aktivität ($p < 0,001$) zu sehen. Etwas schwächer war der p-Wert bei einem Vergleich des Mittelwertes der PK-Aktivität ($p = 0,003$).

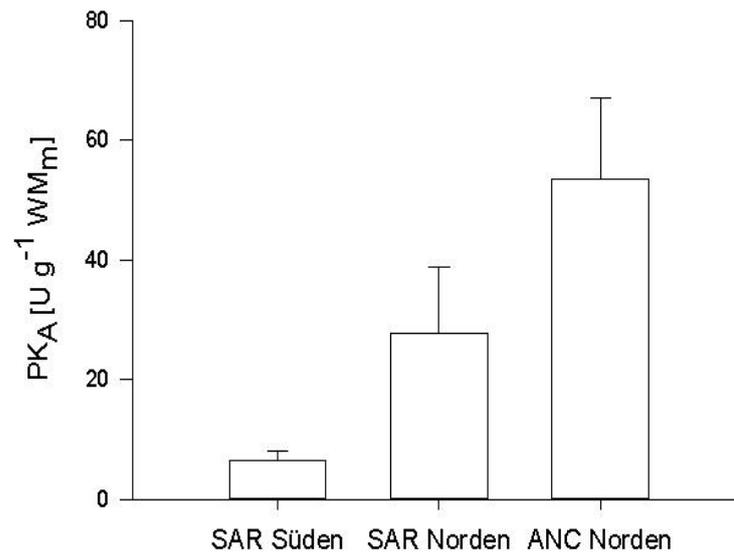


Fig 14: Vergleich der Mittelwerte der spezifischen Pyruvat-Kinase-Aktivitäten (PK_A) zwischen Sardinen aus nördlichen und südlichen Stationen und Sardellen aus nördlichen Stationen

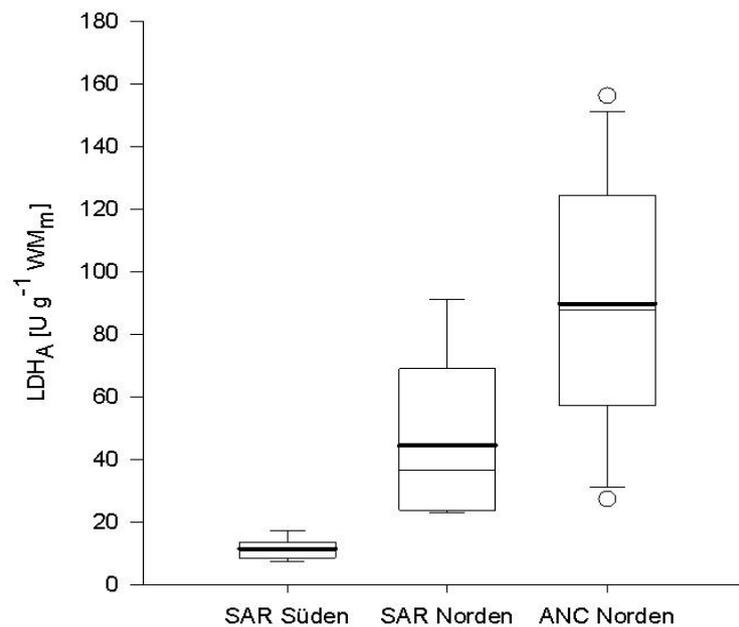


Fig 15: Vergleich der spezifischen Laktat-Dehydrogenase-Aktivitäten von Sardinen aus südlichen und nördlichen Stationen sowie Sardellen aus nördlichen Stationen. Angegeben sind der Mittelwert (dicke Linie), der Median (dünne Linie), neben oberen und unteren Quartilen, ebenso wie minimale und maximale Werte.

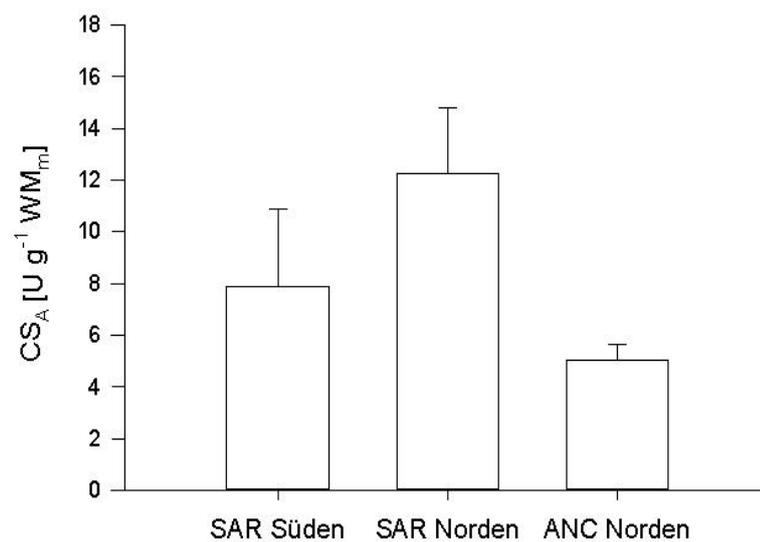


Fig 16: Vergleich der Mittelwerte der spezifischen Citrat-Synthase-Aktivität (CS_A) von Sardinen aus nördlichen und südlichen Stationen und Sardellen aus nördlichen Stationen.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

Allgemein variieren Enzymaktivitäten in Bezug auf die Art (Hickey und Clements, 2003), auf unterschiedliche Entwicklungsstadien (Overnell und Batty, 2000) und Gewebe (Childress und Somero, 1979). Die Wahl des untersuchten Gewebes variiert in der Literatur und hängt ab von der Größe des untersuchten Organismus und vom Schwerpunkt der Forschungsarbeit. Sowohl bei den glycolytischen Enzymen, PK und LDH, als auch bei CS war die Aktivität der Skelettmuskulatur höher als die Aktivität des gesamten Körpers. Einen signifikanten Unterschied gab es jedoch nur bei CS ($p=0,002$). Der Skelettmuskel eines Fisches repräsentiert den Großteil der Körpermasse und stellt die Energie bereit, die bei Protein-Degradation unter unvoreilten Bedingungen benötigt werden. Die höhere Aktivität der glycolytischen Enzyme ist unter anderem bedingt durch hohe lokomotorische Aktivität, die benötigt wird für schnelles plötzliches Schwimmen (Pelletier *et al.*, 1993).

Trotz der geringen Größe der Fische wurde in dieser Arbeit mit dem Muskelgewebe gearbeitet, da es gut zu bearbeiten war, die Proben nicht durch andere Komponenten wie Verdauungsenzyme verunreinigt wurden, und sich reproduzierbare und glaubwürdige Ergebnisse ergaben.

Für die Extraktion und die Zusammensetzung der Reaktionsgemische gibt es unterschiedliche Protokolle, so wurden Enzyme größtenteils mit frisch hergestellten Extrakten untersucht, da herausgefunden wurde, dass sie sensitiv auf ein Einfrieren (Childress und Somero, 1979; Clarke *et al.*, 1992) und verlängerte Lagerzeit (Lannig *et al.*, 2003) reagieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit keine Extrakte eingefroren, sondern erst am Tag der Messung hergestellt und die Aktivitäten zügig gemessen. Volumina der Reaktionsteilnehmer wurden auf das Messen von Enzymaktivitäten juveniler Sardinen und Sardellen eingestellt.

5.2 Spezifische Enzymaktivität und intraspezifischer Vergleich

Die spezifische Enzymaktivität der beprobten nördlichen SAR war sehr klein für CS ($12,26 \pm 2,56 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$) und höher für PK und LDH ($27,76 \pm 10,99 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$ und $44,48 \pm 27,86 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$). Ebenso verteilt waren die Aktivitäten bei ANC, für die

glycolytischen Enzyme wurden jedoch signifikant höhere Werte als bei den nördlichen SAR gemessen. Die spezifische CS-Aktivität war auch hier sehr niedrig ($5,02 \pm 0,66 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$) und deutlich höher für PK ($53,56 \pm 13,52 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$) und LDH ($89,78 \pm 40,45 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$). Bei den südlichen Sardinien hingegen waren alle spezifischen Enzymaktivitäten niedrig ($\text{PK}_A = 6,39 \pm 1,81 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$; $\text{LDH}_A = 11,50 \pm 3,38 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$; $\text{CS}_A = 7,90 \pm 3,06 \text{ U g}^{-1} \text{ WM}_m$).

Schlüsselenzym-Aktivitäten des Stoffwechsels wurden intensiv erforscht, wodurch ihre arten- und entwicklungspezifische Variabilität deutlich wurde. So unterscheiden sich Enzymaktivitäten in weißen Muskeln (glycolytische Enzyme wie PK, LDH) je nach Art und Weise der Fortbewegung, Tiefe des Lebensraumes, Körpergröße und Fressgewohnheit (Pelletier *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurden im Gegensatz zu anderen juvenilen Teleosten vergleichsweise hohe glycolytische Enzymaktivitäten gefunden (Overnell und Batty, 2000; Cooper *et al.*, 2002), die jedoch im Vergleich zur Kap-Bastardmakrele (*Trachurus trachurus capensis*) aus analogen Stationen als heutige dominante Art im Benguela Auftriebsgebiet niedrig waren (Michalek, 2012; unveröffentlicht). Da die Aktivität von PK und LDH für die Kapazität eines Fisches steht, schlagartig schnell zu schwimmen („burst-swimming capacity“, Pelletier *et al.*, 1993), könnten die erhöhten Aktivitäten bei SAR und ANC auf ein aktives Schwimmvermögen hindeuten. Eine mögliche Erklärung für die auffallend niedrigen glycolytischen Enzymaktivitäten der südlichen SAR liegt möglicherweise **in einer geringen Konzentration an gelöstem Sauerstoff in der Umgebung.** Die hier beprobten südlichen Stationen des nördlichen Benguela Auftriebsgebietes lagen in flacheren Gewässern. Es lässt vermuten, dass die Sardinien häufiger hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt waren (Geist, pers. Komm.). Unter solchen Verhältnissen ist die vertikale Verbreitung juveniler Sardinien eingeschränkt (Ekau und Verheye, 2005). Childress und Somero (1979) haben einen exponentiellen Rückgang der glycolytischen und mitochondriellen Enzymaktivität in der weißen Muskulatur, sowie der Respirationsrate bei einigen pelagischen Fischen gefunden, die zunehmend in der minimalen Tiefe ihres Verbreitungsgebietes vorkamen. Sie folgerten, dass sich reduzierte Stoffwechselraten bei Fischen die in Kontakt mit Sauerstoffminimum-Zonen kamen, aus geringeren Enzymkonzentrationen und / oder reduzierter Effizienz der Enzymkatalyse ableiten könnten.

Auffallend waren die sehr niedrigen Konditionsfaktoren, sowohl bei nördlichen ($K_{\text{SAR}} = 0,14 \pm 0,02$; Tab 8) und südlichen ($K_{\text{SAR}} = 0,12 \pm 0,02$) SAR als auch bei ANC ($K_{\text{ANC}} = 0,24 \pm 0,05$). Diese schlechte Kondition der Fische könnte sowohl an einem geringen

Nahrungsvorkommen liegen als auch an einem zu niedrigem Sauerstoffgehalt. „Hunger“ bewirkt ein Sinken der Proteinkonzentration im Muskel und der Menge an glycolytischen Enzymen. Zudem steigen bei höheren Konditionsfaktoren Wachstumsrate und PK-Aktivität stärker an als bei niedrigeren Konditionsfaktoren (Pelletier *et al.*, 1993). Geringe Sauerstoffgehalte können so zu einer signifikanten Reduzierung von Wachstum und Nahrungsaufnahme führen. Die „Appetitlosigkeit“ ist bedingt durch niedrigeren Stoffwechsel und eine längere Zeitspanne des postprandialen Stoffwechsels. So schränkt der Kabeljau spontanes Schwimmen ein, um Sauerstoff für andere Prozesse wie die Verdauung zu nutzen (Chabot und Clareaux, 2008). Dieses Muster zeigte sich in deutlich niedrigeren Enzymaktivitäten bei SAR und ANC im Vergleich zur Makrele.

5.3 Metabolic Scaling

Bei den Enzym-Aktivitäten in Bezug auf das Körpergewicht wurden sehr unregelmäßige allometrische Beziehungen gefunden. Die niedrigen Werte für den Regressionskoeffizienten r^2 deuten auf eine starke Streuung der Werte hin, was vermuten lässt, dass eine höhere Probenzahl das Ergebnis deutlicher machen würde. Dennoch waren einige Trends in der Beziehung zwischen Enzymaktivität und Körpermasse erkennbar, die mit der Literatur übereinstimmen. Sowohl bei den nördlichen als auch bei den südlichen Sardinen bestand eine positive Korrelation zwischen der spezifischen PK-Aktivität und dem Muskelgewicht ($a_{PK} = 0,62$ und $a_{PK} = 0,76$; Tab 7), ebenso wie zwischen LDH-Aktivität der südlichen SAR und dem Muskelgewicht ($a_{LDH} = 0,39$). Bei den Sardellen wurde eine schwächere allometrische Beziehung der LDH-Aktivität gefunden ($a_{LDH} = 0,17$). Die CS-Aktivität sank sowohl bei den nördlichen und den südlichen Sardinen bei steigender Körpergröße ($a_{CS} = -0,16$ und $a_{CS} = -0,67$) als auch bei steigendem Körpergewicht der Sardellen ($a_{CS} = 0,27$).

Im Zuge vieler Studien wurden deutliche positive Korrelationen zwischen Wachstumsrate und den Aktivitäten glykolytischer Enzyme juveniler und larvaler Fische gefunden, wie bei Hering und Plattfisch (Overnell und Batty, 2000) oder Kabeljau (Pelletier *et al.*, 1993). In vielen Fischarten wurde zudem eine negative allometrische Korrelation zwischen CS-Aktivität und Körpergröße gefunden (Overnell und Batty, 2000; Pelletier *et al.*, 1993; Childress und Somero, 1979), die ein Sinken der aeroben Enzymaktivität bei ontogenetischem Wachstum zeigen. Dies spiegelt sich in der negativen Beziehung der CS-Aktivitäten bei SAR und ANC in dieser Arbeit wider. Zusätzlich ist der Citrat-Zyklus

der primäre ATP-Lieferant für den stationären Zustand („steady-state“; Catalàn *et al.*, 2007), aerobes Schwimmen und Leistung. Dementsprechend ist die Citrat-Synthase wichtig für grundlegende metabolische Prozesse in der Zelle (Catalàn *et al.*, 2007).

Das Muskelgewebe juveniler und larvaler Fische besteht zum größten Teil aus weißen Muskelfasern, mit einer geringeren Anzahl an Mitochondrien und dementsprechend niedrigerer mitochondrieller Enzym-Aktivität als bei roten Muskelfasern, aber mit höherer glycolytischer Kapazität (Crabtree und Newsholm, 1972; Stoiber *et al.*, 1999). Während des Wachstums der Larven nimmt das Muskelgewebe exponentiell zu, sodass der relative Anteil an LDH und PK zunimmt und somit auch der Unterschied zwischen mitochondrieller und glycolytischer Aktivität. Dieses Muster zeigte sich deutlich bei juvenilen Sardinen, wo PK- und LDH-Aktivität anstiegen während die CS-Aktivität bei zunehmender Körpergröße geringer wurde. Die Abnahme der PK- und LDH-Aktivität bei zunehmendem Körpergewicht der ANC ($a_{PK} = -1,175$ und $a_{LDH} = -0,54$) ebenso wie die negative Korrelation der LDH-Aktivität bei den nördlichen Sardinen lässt sich hier nicht eindeutig erklären. Eine Vermutung ist, dass der Umfang der Proben nicht ausreichend unterschiedliche Entwicklungsstadien beinhaltet hat um eine positive allometrische Korrelation deutlich zu machen. 

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Basisdaten von Schlüsselenzymen aus dem Stoffwechsel juveniler Sardinen (*Sardinops sagax*) und Sardellen (*Engraulis capensis*) aus dem nördlichen Benguela Auftriebsgebiet ermittelt. Es ließ sich erkennen, dass Enzymaktivitäten und steigende Körpergrößen in einem allometrischen Verhältnis zueinander stehen. Der Vergleich mit der heute vorherrschenden Kap-Bastardmakrele (*Trachurus trachurus capensis*) zeigte, dass sowohl aerobe als auch anaerobe Enzymaktivitäten bei SAR und ANC niedriger waren. Die hier gefundene geringe Kondition von Sardine und Sardelle bestätigen die Vermutung, dass ein Hauptgrund für das Einbrechen der Bestände, die sich ausbreitenden hypoxischen Verhältnisse im NBUS ist. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass bis heute weder die Südafrikanische Sardine noch die Südafrikanische Sardelle die nötigen Anpassungen zeigen um unter den veränderten Umweltbedingungen überleben zu können.

Literaturverzeichnis

- Berges, J.A. & Ballantyne, J.S., 1991. Size scaling of whole-body maximal enzyme activities in aquatic crustaceans. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, pp.2385-2394.
- Berges, J.A., Rolff, J.C. & Ballantyne, J.S., 1990. Relationship between body size, growth rate and maximal enzyme activities in the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Growth (Lakeland)*, 179, pp.287-296.
- Bianchi, G. et al., 1999, FAO species identification field guide for fishery purposes. The living marine resources of Namibia, Rome
- Boyer, D.C., Boyer, H.J., Fossen, I. & Kreiner, A., 2001. Changes in abundance of the northern Benguela sardine stock during the decade 1990–2000, with comments on the relative importance of fishing and the environment. *South African Journal of Marine Science*, 23(1), pp.67-84.
- Catalàn, I. et al., 2007. Response of muscle-based biochemical condition indices to short-term variations in food availability in post-flexion reared sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) larvae. *Journal of Fish Biology*, 70(2), pp.391-405.
- Chabot, D. & Claireaux G., 2008. Environmental hypoxia as a metabolic constraint on fish: The case of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6–12), pp.287-294.
- Childress, J.J. & Somero, George N., 1990. Metabolic Scaling: A New Perspective Based on Scaling of Glycolytic Enzyme Activities. *Amer. Zoology*, 30, pp.161-173.
- Childress, J.J. & Somero, George N., 1979. Depth-related enzymatic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, 112, pp.31-36.
- Clarke, M.E. et al., 1992. Effects of nutrition and temperature on metabolic enzyme activities in larval and juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*, and lane snapper, *Lutjanus synagris*. *Marine biology*, 112, pp.31-36.
-

-
- Cooper, R.U. et al., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279(1-2), pp.1-20.
- Crabtree, B. & Newsholm, E.A., 1979. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenase in muscles from vertebrates and invertebrates. *The Biochemical Journal*, 126(1), pp.49-58.
- Cury, P. & Shannon, L., 2004. Regime Shifts in upwelling ecosystems: observed changes and possible mechanisms in the northern and southern Benguela. *Progress In Oceanography*, 60(2-4), pp.223-234.
- Ekau, W. et al., 2012. Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeoscience*, 7, pp.1669-1669.
- Ekau, W. and Verheye, H. M., 2005. Influence of oceanographic fronts and low oxygen on the distribution of ichthyoplankton in the Benguela and southern Angola currents, *African Journal of Marine Science*, 27, pp.629–639.
- Hamukuaya, H., O`Toole, M.J. & Woodhead, P.M.J., 1998. Observations of severe hypoxia and offshore displacements of Cape hake over the Namibian shelf in 1994. *South African Journal of Marine Science*, 19(1), pp.57-59.
- Heymans, J., 2004. Changes in the northern Benguela ecosystem over three decades: 1970s, 1980s, and 1990s. *Ecological Modelling* 172(2-4), pp.175-195.
- Hickey, A.J.R. & Clements, K.D., 2003. Key metabolic enzymes and muscle structure in triplefin fish (Tripterygiidae): a phylogenetic comparison. *Biochemical, systemic and environmental physiology*, 173(2), pp.113-23.
- Lannig, et al., 2003. Temperature adaption in eurytherm cod (*Gadus morhua*): a comparison of mitochondrial enzyme capacities in boreal and arctic populations. *Marine Biology*, 142, pp.586-599.
-

-
- Lushak, V.I. et al., 2001. Influence of exercise on the activity and distribution between free and bound forms of glycolytic and associated enzymes in tissues of horse mackerel. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(8), pp.1055-1064.
- Michalek, K.; 2012. Activity of metabolic key enzymes in early life stages of Cape horse mackerels, *Trachurus trachurus capensis* from the Northern Benguela Current Upwelling System. Unveröffentlichte MSc-Arbeit
- Overnell, J. & Batty, R.S., 2000. Scaling of enzyme activity in larval herring and plaice: effects of temperature and individual growth rate on aerobic and anaerobic capacity. *Journal of Fish Biology*, 56, pp.577-589.
- Pelletier, d., Guderley, H. & Dutil, J.-D., 1993. Effects of growth rate, temperature, season and body size on glycolytic enzyme activities in the white muscle of atlantic cod (*Gadus morhua*). *The Journal of Experimental Zoology*, 265, pp.477-478.
- Pelletier, d., Guderley, H. & Dutil, J.-D., 1993. Does the aerobic capacity of fish muscle change in growth rates? *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(2), pp.83-93.
- Shannon, L.V. & O`Toole, R.M., 2003. Sustainability of the Benguela: ex Africa semper aliquid novi. In K. Sherman & G. Hempel, eds. *Large Marine Ecosystems of the World-Trends in Exploitation, Protection and Research*.
- Sidell, B.D. et al., 1987. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preference in fish hearts. *Physiological Zoology*, 60(2), pp.221-232.
- Stoiber, W., Haslett, J.R. & Sänger, A.M., 1999. Myogenetic pattern in teleosts: what does the present evidence really suggest? *Journal of Fish Biology*, 55(Supplement A), pp.84-99.
-

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken (dazu zählen auch Internetquellen) entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Bremen, _____

Sonja-Franziska Heeling