

Humboldt-Universität zu Berlin



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I
Institut für Biologie

Bachelorarbeit

Zum Erwerb des akademischen Grades

Bachelor of Science

„Das Huminstoffpräparat HuminFeed moduliert Lebensdauer und Fruchtbarkeit von *Moina macrocopa* Straus“

„The humic substances preparation HuminFeed modulates lifespan and fertility of *Moina macrocopa* Straus“

vorgelegt von

Ramona Rauch
geb. am 12.01.1981 in Berlin

Immatrikulations-Nr.: 509238

angefertigt in der Arbeitsgruppe Gewässer- und Stressökologie
am Institut für Biologie

Berlin, 06.02.2009

Abstract

Humic substances are an important biogeochemical ecological factor that can initiate chemical stress in exposed organisms. The effects of stress by humic substances on Darwinian fitness are the subject of this thesis. Lifespan and fertility of the cosmopolitan water flea *Moina macrocopa* were examined under exposure of humic substances at environmentally realistic concentrations.

By adding HuminFeed, a commercial soil preparation, to water fleas medium lifespan of *M. macrocopa* extended and a trend to increased offspring were detected.

The conclusion of the results is that humic substances modulate lifespan and reproduction rate of *M. macrocopa*. They cause mild stress, which has positive consequences to Darwinian fitness and leads to hormetic effects.

Zusammenfassung

Huminstoffe sind ein bedeutender biogeochemischer ökologischer Faktor, der in exponierten Organismen chemischen Stress auslösen kann. Die Auswirkungen des durch einen Huminstoff verursachten Stresses auf die Darwinsche Fitness stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Beim kosmopolitischen Wasserfloh *Moina macrocopa* wurden die Lebensdauer und die Fruchtbarkeit unter Huminstoffexposition untersucht.

Durch die Zugabe von HuminFeed, einem kommerziellen Bodenextrakt, zum Wasserfloh-Medium wurde eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer bei *M. macrocopa* hervorgerufen, und ein Trend zur Erhöhung ihrer Nachkommenzahl wurde sichtbar.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Huminstoffe die Lebensdauer und die Fruchtbarkeit beim Wasserfloh *M. macrocopa* modulieren. Dabei verursachen sie in geringen Konzentrationen milden Stress, der sich positiv auf die Darwinsche Fitness des Wasserflohs auswirkt und hormetische Effekte erzielt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Methoden und Materialien	8
2.1	Moina macrocopa	8
2.2	Zusammensetzung des Daphnien-Medium	8
2.3	Futteralgen	9
2.4	Huminstoff	9
2.5	Versuchsbedingungen	11
2.6	Versuchsansätze	11
2.7	Datenerhebung	16
2.8	Statistik	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Versuchsreihe 1	19
3.2	Versuchsreihe 2	22
3.3	Versuchsreihe 3	24
3.4	Versuchsreihe Männchen	27
4	Diskussion	29
	Danksagung	37
	Literaturverzeichnis	38
	Eigenständigkeitserklärung	

1 Einleitung

„Stress is the Spice of Life; the Absence of Stress is Death“

(Hans Selye, Begründer der Stresstheorie)

Stress ist ein Thema, das u.a. Mediziner, Sozialwissenschaftler, Psychologen, Zoologen und Botaniker seit Jahrzehnten beschäftigt hat und in unterschiedlicher Weise definiert wurde.

Selye, der Begründer der Stresstheorie, hat Stress als Verschleiß bezeichnet, dem jedes Lebewesen in jedem Moment seines Lebens ausgesetzt ist (Selye 1970). Später wurde Stress auch als Ereignis (physikalisch, chemisch, biologisch) definiert, das auf das innere Gleichgewicht eines Organismus wirkt, (Moberg 1975, Rattan 2004, Calabrese & Baldwin 2001). Einige haben die Stressdefinition auch auf Ökosysteme ausgeweitet: Hoffmann & Parsons (1991) sehen Stress als ein Ereignis an, das einen Organismus oder ein Ökosystem zum Nachteil gereicht, wenn es dazu führt, dass ein Übermaß an Energie lang anhaltend aufgebracht werden muss. Diese Definition integriert die Annahme, dass Stress auch positive Auswirkungen zeigen kann. Laugero & Moberg (2000) dagegen sind der Ansicht, dass jeglicher Stress biologische Kosten verursacht. Diese Kosten werden allerdings unbedeutend sein, wenn der Organismus dem Stress nur kurzzeitig ausgesetzt ist.

Als Stressverursacher kommen sämtliche biotischen und abiotischen Umweltfaktoren in Betracht, die dann Stressfaktor oder auch Stressor genannt werden (Moberg 1975, Rattan 2004, Calabrese & Baldwin 2003). Bisher wurden über 900 Umweltfaktoren oder Substanzen ermittelt, die Stress verursachen können (Calabrese & Blain 2005). Temperatur, Druckverhältnisse, Elektrizität und Strahlung sind einige der physikalischen Umweltfaktoren, die als Stressor wirken können (Moberg 1975,

Rattan 2004). Ebenso zählen Schwermetalle, Ionen und chemische Substanzen zu den Stressfaktoren (Sanders 1993, Feder & Hofmann 1999).

Auch Huminstoffe sind als Stressoren bekannt (Steinberg 2008, Prokhotskaya & Steinberg 2007, Timofeyev et al. 2007). Sie sind weit verbreitet und stellen ca. 60 % - 80 % des gelösten organischen Kohlenstoffs dar (Timofeyev et al. 2007, Steinberg et al. 2008). Huminstoffe weisen phenolischen Strukturen auf, die sich von Ligninen und Tanninen ableiten (Leenheer & Rostad 2004). Eine Vielzahl funktioneller Gruppen wie Carboxyl-, Phenyl-, aromatische, aliphatische, ketonische und chinoide Gruppen sind ein strukturelles Merkmal von Huminstoffen (Steinberg et al. 2006). Diese Gruppen sind für Interaktionen mit biologischen Systemen verantwortlich und führen dazu, dass Huminstoffe das Potential chemischer Stressoren besitzen (Steinberg et al. 2008, Steinberg et al. 2006).

Untersuchungen sprechen dafür, dass Huminstoffe von Organismen aufgenommen werden, die verschiedensten Reaktionen auslösen können und mit Biomembranen interagieren (Timofeyev et al. 2007, Steinberg et al. 2008, Steinberg et al. 2007). Hierbei wird zwischen direkten und indirekten Effekten unterschieden (Steinberg et al. 2006, Steinberg & Brüggemann 2002). Zu spezifischen Effekten zählen sowohl Interaktionen mit dem Photosynthese-Apparat als auch die Wirkung als hormonähnliche Substanz oder als chemischer Lockstoff (Steinberg et al. 2008, Timofeyev et al. 2007). Als indirekte Effekte gelten u.a. die Induktion von Chaperonen, heat-shock-Proteine und von Antioxidantien (Steinberg et al. 2008). Huminstoffe können oxidativen Stress und andere Stress-Symptome hervorrufen (Steinberg et al. 2008, Steinberg et al. 2007), die sich z.B. negativ auf das Wachstum besonders von phototrophen Organismen auswirken (Prokhotskaya & Steinberg 2007). Von der allgemeinen Eigenschaft der Huminstoffe, in exponierten aquatischen Organismen Stressreaktionen hervorzurufen, kann somit ausgegangen werden und braucht im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal bestätigt werden. Vielmehr stehen die Auswirkungen derartiger Stressreaktionen im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Denn neben den genannten Stressreaktionen exponierter Organismen sind auch positive Effekte festgestellt worden. Huminstoffe können die physiologischen Konditionen von Lebewesen verbessern und damit die Auswirkungen von Stress mindern (Meinelt et al. 2008). Sie verringerten die Wirkung von toxischen Substanzen (Meinelt et al. 2001) und erwiesen sich als positiv für den Ionenhaushalt in kalkarmen Gewässern (Steinberg et al. 2007). Der Nematode *C. elegans* (Maupas) zeigte in dem Versuch von Steinberg et al. (2007), dass Huminstoffe als Lockstoff für den Nematoden fungierte. Außerdem wurden Effekte z.B. auf die Lebensdauer oder Reproduktion von Organismen beobachtet (Euent et al. 2008, Steinberg et al. 2007, Hercus et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, die Verallgemeinerbarkeit der obigen Aussagen zu testen, indem ein weiterer Organismus hinsichtlich Lebensspanne und Fruchtbarkeit studiert wurde, wenn er gegen einen schon mehrfach getesteten Huminstoff exponiert wurde. Es ist dies der kosmopolitische Wasserfloh, *Moina macrocopa* Straus, der für einen kurzen Lebenszyklus bekannt ist.

In drei verschiedenen Versuchsreihen wurde untersucht, ob Veränderungen in der Reproduktionsrate und/oder Lebensdauer weiblicher Wasserflöhe bei unterschiedlichen Konzentrationen eines Huminstoffes festzustellen sind. Ebenfalls wurde überprüft, ob durch Huminstoffe im Medium in unterschiedlichen Konzentrationen Veränderungen im Geschlechterverhältnis der Nachkommen verursachen. In einem weiteren Versuch wurde der Lebensdauerer test auch bei männlichen Wasserflöhen dieser Art bei verschiedenen Huminstoffkonzentrationen vorgenommen.

2 Methoden und Materialien

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden näher beschrieben.

2.1 *Moina macrocopa*

Bei unserem Versuchstier handelt es sich um die Wasserflohart *Moina macrocopa* Straus (1820) auch Japanischer Wasserfloh oder Japanischer Kugelwasserfloh genannt (Suhett 2008a). Seine Verbreitung reicht von den Tropen bis zu den gemäßigten Breiten auf fast allen Kontinenten (Petrušek 2002, Petrušek et al. 2004). Die Familie der Moinidae wird zu den Cladocera und damit zu den Phyllopoda unter den Crustacea gezählt (Brohmer 2006 S. 178ff, Storch und Welsch 2004 S. 312ff, Munk 2002 S. 1-68ff). Die untersuchten Wasserflöhe wurden im April 2008 aus einer Regenpfütze in der Nähe des Gebäudes des Landwirtschaftsministeriums in Rio de Janeiro / Brasilien mit einer leeren Wasserflasche entnommen (Suhett 2008b). Im Laboratório de Limnologia / UFRJ in Rio de Janeiro / Brasilien wurden die Tiere über mehrere Generationen in käuflichem Mineralwasser gehalten und damit akklimatisiert. Die Identifikation erfolgte von einem Taxonomen der UFRJ. Die Tiere wurden mit Erlaubnis der zuständigen brasilianischen Behörden durch J. Santangelo nach Deutschland ausgeführt und uns zur Verfügung gestellt.

2.2 Zusammensetzung des Daphnien-Medium

Während des Transportes nach Deutschland wurde zum Teil abgestandenes Leitungswasser aber auch Mineralwasser aus dem Supermarkt als Medium verwendet (Santangelo 2008).

In den Versuchsreihen ist künstliches Medium (Daphnien-Medium) zum Teil gemischt mit Berliner Leitungswasser¹ eingesetzt worden. Das Daph-

nien-Medium wurde nach Klüttgen mit einer veränderten NaHCO₃-Konzentration gefertigt (Klüttgen et al. 1994). Statt den vorgegeben 2,2 ml/l der NaHCO₃-Lösung zu verwenden, wurden 20 ml dieser Lösung dem Daphnien-Medium zugesetzt, da für weitere Versuche im hiesigen Labor eine größere Säure-Pufferkapazität des Mediums benötigt wurde.

2.3 Futteralgen

Als Futter wurden die Grünalge *Scenedesmus armatus* Chod. und die Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindák (syn. *Raphidocelis subcapitata*, *Ankistrodesmus subcapitata*, *Selenastrum capricornutum*) verwendet. Muñoz-Mejía & Martínez-Jerónimo (2007) haben gezeigt, dass *P. subcapitata* für mehrere Cladoceren als Futteralge gut geeignet ist. Beide Algen wurden der Algenstammsammlung des Instituts für Biologie, AG Gewässer- und Stressökologie, der Humboldt-Universität in Berlin entnommen.

Im Daphnienzuchtraum wurden die Algen bei 24 h Dauerlicht (Leuchtstoffröhren: cool white und warm white, L36W/20 von Osram oder von Lampi) und einer Lufttemperatur von 21 °C ± 1 °C unter ständiger Luftzufuhr in Glaskolben mit einem Volumen von 1 l kultiviert. Die Kolben wurden mit Algen-Medium gefüllt (Nicklisch et al. 2008) und mit einer kleinen Menge der Stammkultur angeimpft. Um eine gleichmäßige Futterqualität zu erzielen, wurde versucht, die Algen durch Ernten in regelmäßigen Abständen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten.

2.4 Huminstoff

In allen Versuchsansätzen wurde HuminFeed[®] (von Humintech²) als zu testender Huminstoff verwendet. Es enthält 43 % organischen Kohlenstoff und lag als Feststoff vor, der im Kühlschrank bei 9 °C gelagert wurde. HuminFeed (HF) wurde in destilliertem Wasser in einer Konzentration

² Weitere Informationen siehe unter <http://www.humintech.com/001/animalfeeds/products/huminfeed.html>

35 mmol/l DOC (1 g/l HF) als Stammlösung gelöst, um dann als Lösung den Versuchskolben zugesetzt werden zu können.

Es ist bekannt, dass Huminstoffe photolytisch abgebaut werden können (z.B. Farjalla et al. in press). Aus diesem Grund wurde in einem Vortest untersucht, ob die mit dem Huminstoff angereicherten Medien auch nach zwei Tagen im Dauerlicht die gleiche Konzentration an HuminFeed aufwiesen, mit der sie angesetzt wurden (Ergebnisse siehe weiter unten). Mittels Spektrophotometer (DU[®] 640 von Beckman) wurde die Extinktion der Medien mit verschiedenen HuminFeed-Konzentrationen gemessen. Dabei wurde vorerst geprüft, bei welcher Wellenlänge die exaktesten Ergebnisse erzielt werden. Anhand der ermittelten Werte konnte eine Eichkurve für die Extinktion bei einer Wellenlänge von 400 nm erstellt werden:

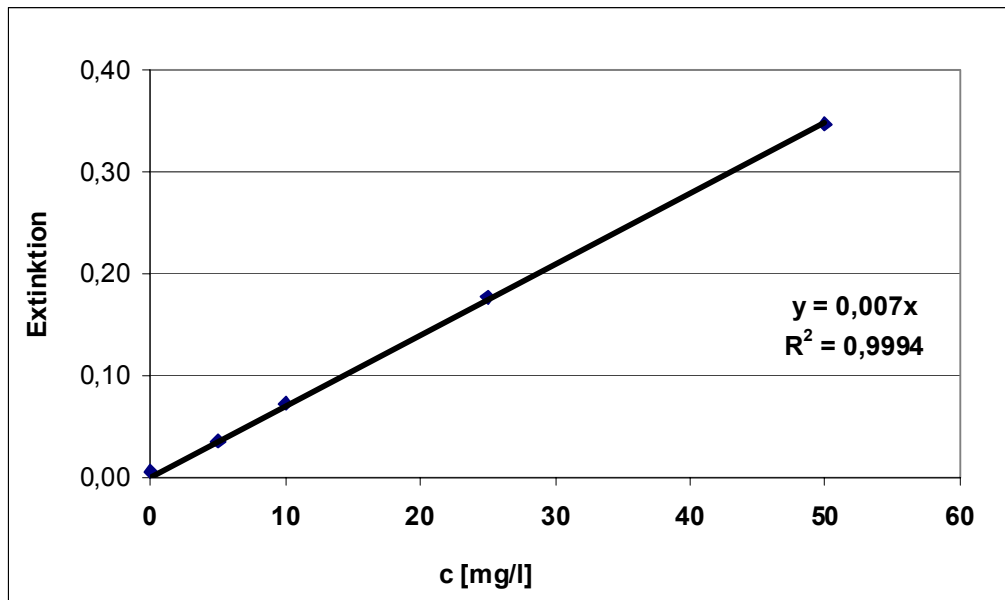


Abbildung 1: Eichkurve – Extinktion von HuminFeed bei $\lambda = 400\text{nm}$

Anschließend ist das Medium mit einer Konzentration von 0,18 mmol/l DOC (5 mg/l HF) und ein anderes mit einer Konzentration von 0,90 mmol/l DOC (25 mg/l HF) in jeweils einem Glasgefäß unter Dauerlicht zwei Tage in den Daphnien-Zuchtraum gestellt worden. Nach diesen zwei Tagen wurden nochmals photometrische Messungen bei beiden Medien vorgenommen und anhand der Eichkurve die Konzentration bestimmt. In dem ersten Glasgefäß wurde eine Konzentration von 0,19 mmol/l DOC (5,39 mg HF/l) und im Zweiten eine Huminstoffkonzentration von 0,91 mmol/l DOC (25,35 mg HF/l) anhand der Eichkurve

ermittelt. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Konzentration des hier verwendeten Huminstoffes auch bei Dauerlicht während zwei Tagen nicht veränderte. Wenn in den folgenden Versuchen die Medien alle zwei Tage gewechselt werden, war anzunehmen, dass die HuminFeed-Konzentration in diesem Zeitraum erhalten blieb.

2.5 Versuchsbedingungen

Die erste Versuchsreihe unterschied sich hinsichtlich der Versuchsbedingungen von den übrigen drei. Die Wasserflöhe in der ersten Versuchsreihe wurden im Daphnienzuchtraum im Keller des Instituts bei 24 h Dauerlicht (drei Leuchtstoffröhren: cool white, L36W/20 von Osram) und einer Lufttemperatur von $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufbewahrt.

Ab der zweiten Versuchsreihe wurden die Tiere in einem Wasserbad in einem Aquarium gehalten. Hier konnte die Temperatur mittels zweier Heizstäbe bei $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gehalten werden. Bei dieser Temperatur wurden höhere Reproduktionsraten bei mehreren Cladoceren als bei niederen Temperaturen gefunden (Bunioto & Arcifa 2007). Mit Leuchtstoffröhren, die unter dem Aquarium angebracht waren, wurde mit Hilfe einer Zeitschaltuhr ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h (Licht:Dunkel) wie in tropischen Gebieten eingestellt. Dunkle Kunststoffplatten, die um das Aquarium herum befestigt wurden, verhinderten den Einfall von Licht anderer Quellen.

2.6 Versuchsansätze

Da in der AG Gewässer- und Stressökologie erstmals mit *M. macrocopa* gearbeitet wurde, wurde die Kultivierung schrittweise optimiert. Es wurden die Versuchsbedingungen ermittelt, unter denen *M. macrocopa* eine offensichtlich hohe Fitness aufwies.

Für die Versuchsreihen wurden viele gleich alte Tiere benötigt. Aus diesem Grund ging den eigentlichen Experimenten die Zucht auf Biomasse

voraus. Ursprünglich wurden zehn annähernd gleich große Individuen der Stammkultur (hier 1. Generation genannt) jeweils in ein Glasgefäß gesetzt, dem 20 ml Medium und 5 ml einer Hefelösung (0,1 g/l) zugegeben wurden. Die Gefäße wurden auf dem Labortisch am Fenster im Labor des Instituts platziert. Die Raumtemperatur betrug während der Biomassezucht $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Nachdem bei vier der Individuen die Reproduktion eingesetzt hatte, sind die jeweiligen Nachkommen eines Muttertieres auf Glaskolben mit einem Volumen von 100 ml übertragen worden (maximal 20 Tiere pro Kolben). Ab der 2. Generation sind 45 ml Daphnien-Medium mit 45 ml abgestandenem Leitungswasser verdünnt worden. Gefüttert wurde mit 10 ml Algensuspension (*P. subcapitata*) und 5 ml der Hefelösung. Mit den Nachkommen der 3. Generation eines Tages, die ursprünglich vom gleichen Weibchen der 1. Generation abstammten und die die größte Nachkommenzahl bildeten, wurde die Biomassezucht weitergeführt. Das Verfahren wurde bis zur 5. Generation beibehalten. Die Nachkommen der 5. Generation wurden für die Versuchsreihe 1 verwendet.

In Versuchsreihe 1 wurden parallel vier Ansätze mit unterschiedlichen Huminstoff-Konzentrationen getestet:

Ansatz 1: 0 mmol/l DOC (0 mg HF/l – Kontrolle)

Ansatz 2: 0,18 mmol/l DOC (5 mg HF/l)

Ansatz 3: 0,54 mmol/l DOC (15 mg HF/l)

Ansatz 4: 1,08 mmol/l DOC (30 mg HF/l).

Zehn junge Individuen der 5. Generation des gleichen Tages sind in einem Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 100 ml eingesetzt worden. Pro Ansatz gab es fünf Wiederholungen, so dass 50 Wasserflöhe auf fünf Kolben je Ansatz verteilt wurden. Insgesamt wurde die erste Versuchsreihe mit 200 Tieren gestartet. Als Futter wurde anfänglich 20 ml der *P. subcapitata*-Suspension pro Kolben verwendet. Am 3. Versuchstag wurde unterm Stereo-Mikroskop (SMZ-U von Nikon) anhand der 1. Antenne (Anntenula) das Geschlecht der eingesetzten Wasserflöhe bestimmt. Bei den männlichen Moinidae ist sie im Gegensatz zu den Weib-

chen stark verlängert (Gruner: Lehrbuch der Speziellen Zoologie S. 566, Olmstead & LeBlanc 2007).



Abbildung 2: Männchen von *M. macrocopa*³

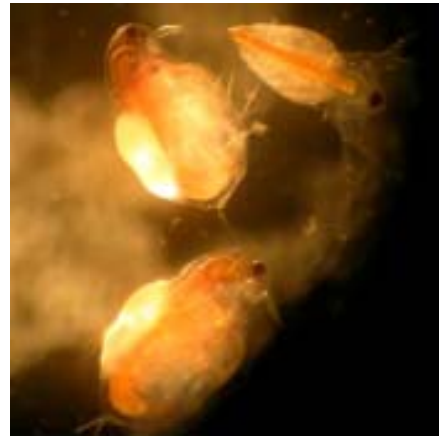


Abbildung 3: Weibchen von *M. macrocopa*³

Die männlichen Tiere wurden aus den Versuchskolben entfernt. Ab dem 6. Versuchstag ist das Futter auf *S. armatus* umgestellt worden, da es auf Grund der Vielzahl parallel laufender Versuche anderer Studenten Engpässe in der Verfügbarkeit der *P. subcapitata*-Suspension gab. Von diesem Zeitpunkt an ist in die Kolben 10 ml Algen-Suspension und die dem Ansatz entsprechende Menge HuminFeed gegeben und dann mit Daphnien-Medium auf 100 ml aufgefüllt worden. Die Ansätze sind alle 48 Stunden erneuert und die lebenden adulten Tiere in die neuen Erlenmeyerkolben übertragen worden. In Versuchsreihe 1 wurde sowohl der Lebensdauertest durchgeführt als auch die Reproduktionsrate ermittelt. Da erst einige Tage nach Beginn des Versuchs konstante Versuchsbedingungen vorgelegen haben, sind nur die Ergebnisse ab dem 6. Versuchstag für die Datenanalyse herangezogen worden.

Für die Versuchsreihe 2 sind ebenfalls mit ausgehend von zehn Tieren der Stammkultur die notwendige Zahl an Nachkommen herangezogen worden. Die 1. Generation wurde in Glasgefäße mit einem Volumen von 20 ml eingesetzt. Die Nachkommen der 2. Generation eines Weibchens, die selbst wiederum die meisten Nachkommen erzeugten, wurden für die weitere Biomassezucht verwendet. Sowohl für die Biomassezucht als

auch für die folgenden Testreihen wurde abgestandenes Leitungswasser mit Daphnien-Medium in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Als Futter wurden 10 ml der *S. armatus* - Suspension bei 90 ml Medium-Leitungswasser-Gemisch verbraucht. Ab der 2. Generation wurden jeweils in einem Glaskolben ($V = 100$ ml) maximal 10 Individuen eingesetzt. Die eigentliche Versuchsreihe wurde mit den Nachkommen der 3. Generation begonnen. Es wurden folgende Kolben mit HuminFeed angesetzt:

Ansatz 1: 0 mmol/l DOC (0 mg HF/l – Kontrolle)

Ansatz 2: 0,04 mmol/l DOC (1 mg HF/l)

Ansatz 3: 0,18 mmol/l DOC (5 mg HF/l)

Ansatz 4: 0,90 mmol/l DOC (25 mg HF/l).

Die Individuen von Ansatz 2 sind bereits einen Tag nach dem Umsetzen verstorben, so dass die Versuchsreihe nur mit den Ansätzen 1, 3 und 4 fortgesetzt wurde. Ein Grund hierfür könnte eine Kontamination der Glasgefäße gewesen sein. Einen Tag nach dem Umsetzen wurden die Geschlechter der Versuchstiere bestimmt. Mit den Nachkommen der zweiten bis vierten Brut der 3. Generation wurde ebenso verfahren. Pro Ansatz waren letztendlich fünf bis sechs Glasgefäße mit je maximal zehn Weibchen vorhanden, wobei die Weibchen verschiedener Glaskolben auch unterschiedlichen Alters waren. Jeden zweiten Tag wurden die Erlenmeyerkolben ausgewaschen und das Medium gewechselt. Die überlebenden adulten Weibchen wurden in die Kolben zurückgeführt, während die Nachkommen jedes Ansatzes gezählt und in neu angesetzte Glaskolben überführt wurden. Am nächsten Tag wurden die Geschlechter der Nachkommen unter dem Stereo-Mikroskop bestimmt. Ziel von Versuchsreihe 2 war, eventuell vorhandene Unterschiede beim Geschlechterverhältnis der Nachkommen und in der Reproduktionsrate, die durch Stressbedingungen hervorgerufen werden, festzustellen.

Die Nachkommen eines Tages der Kontrolle (0 mmol/l DOC) aus Versuchsreihe 2 sind für die Versuchsreihe 3 weiter verwendet worden. Nach einem Tag wurden die Geschlechterbestimmung vorgenommen und drei Ansätze gefertigt:

Ansatz 1: 0 mmol/l DOC (0 mg HF/l – Kontrolle)

Ansatz 2: 0,18 mmol/l DOC (5 mg HF/l)

Ansatz 3: 0,90 mmol/l DOC (25 mg HF/l).

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Ergebnisse durch Dichtestress beeinflusst werden, ist in dieser Reihe jedes Weibchen in einen Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 100 ml allein überführt worden. Pro Ansatz wurden zehn Kolben gefertigt, so dass letztendlich mit 30 Wasserflöhen in dieser Versuchsreihe gearbeitet wurde. Sie wurden wie bereits in Versuchsreihe 2 mit je 10 ml Algensuspension von *S. armatus* gefüttert. Es wurde jeden Tag nachgeschaut, ob Weibchen verstorben sind. Jeden zweiten Tag wurden die Kolben ausgewaschen, das Medium erneuert und neue Futteralgen zugegeben. In dieser Versuchsreihe wurden neben dem Lebensdauerstest auch die Reproduktionsrate und die Geschlechterzusammensetzung der Nachkommen untersucht.

In einer vierten Versuchsreihe wurden Männchen verwendet, die in Versuchsreihe 2 produziert wurden. Die Nachkommen eines Ansatzes in Versuchsreihe 2 wurden bis zur Bestimmung des Geschlechts in Glaskolben ($V = 200$ ml) aufbewahrt. Entsprechend des Ansatzes, zu dem sie gehörten, wurde dem Medium-Leitungswasser-Gemisch der Huminstoff in der vorgesehenen Konzentration zugesetzt:

Ansatz 1: 0 mmol/l DOC (0 mg HF/l – Kontrolle)

Ansatz 2: 0,18 mmol/l DOC (5 mg HF/l)

Ansatz 3: 0,90 mmol/l DOC (25 mg HF/l).

Nach der Geschlechterbestimmung wurden die Männchen in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt (maximal zehn Tiere pro Kolben). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Männchen für den Ansatz verwendet wurden, dessen Huminstoffkonzentration gleich dem Ansatz war, aus dem sie stammten. Demnach wurden drei Ansätze vorbereitet:

Ansatz 1: 0 mmol/l DOC (0 mg HF/l – Kontrolle)

Ansatz 2: 0,18 mmol/l DOC (5 mg HF/l)

Ansatz 3: 0,90 mmol/l DOC (25 mg HF/l).

Da die Anzahl der Männchen unter den Nachkommen von Ansatz zu Ansatz verschieden war, war auch die Zahl der Versuchsobjekte pro Ansatz unterschiedlich:

Ansatz 1: 27 Tiere, Ansatz 2: 31 Tiere, Ansatz 3: 13 Tiere.

Bei den drei Ansätzen wurde der Lebensdauererprobungsversuch durchgeführt.

2.7 Datenerhebung

Bei den verschiedenen Versuchsreihen wurden Daten zur Bestimmung der Lebensdauer, zur Reproduktionsrate und zur Geschlechterbestimmung der Nachkommen aufgenommen.

Für den Lebensdauererprobungsversuch wurde mit Ausnahme von Versuchsreihe 1 täglich überprüft, wie viel überlebende adulte Tiere in den Versuchskolben vorhanden waren.

In Versuchsreihe 1 wurde die Datenerhebung hinsichtlich des Lebensdauererprobungsversuchs nur im Zusammenhang mit der Bestimmung der Reproduktionsrate durchgeführt. Die Datenermittlung war bei Versuchsreihe 1 in den ersten Tagen auf Grund der hohen Ausgangszahl der Versuchstiere und der mangelnden praktischen Erfahrung mit Wasserflöhen sehr zeitintensiv. Aus diesem Grund konnten anfangs nur die Tiere der Hälfte der Versuchskolben an einem Tag untersucht werden, so dass die andere Hälfte den Tag darauf gezählt wurde. Demnach wurden die Daten auch für den Lebensdauererprobungsversuch im Abstand von zwei Versuchstagen für die erste Hälfte und um einen Tag versetzt für die zweite Hälfte der Versuchstiere erhoben. Ab Versuchstag 10 konnte die Datenaufnahme bei sämtlichen Versuchskolben an einem Tag durchgeführt werden, so dass ab diesem Zeitpunkt jeden zweiten Versuchstag hinsichtlich aller Versuchstiere die Zahl der Überlebenden ermittelt wurde.

Tiere, die auch nach Agitieren und Einsaugen mit der Pipette keine Bewegungen zeigten, sind als tot gewertet worden.

Die Datenerhebung hinsichtlich der Reproduktionsrate wurde in Versuchsreihe 1 und 2 jeden zweiten Versuchstag vorgenommen. Bei Versuchsreihe 3 wurden die Nachkommen an dem Tag gezählt, an dem sie erstmals im Versuchskolben gesehen wurden. Da in Versuchsreihe 3 jeweils nur ein adultes Weibchen pro Kolben gehalten wurde, konnte genau bestimmt werden, wann ein Weibchen Nachkommen erhalten hat und auch die Zahl der Nachkommen konnte für ein bestimmtes Weibchen ermittelt werden.

Um die Anzahl der Nachkommen in einem Versuchskolben auszählen zu können, wurde der Inhalt eines Kolbens vorsichtig in eine weiße Photoschale mit den Maßen 180 mm × 130 mm × 30 mm (l × t × b) geschüttet. Mittels einer 3 ml – Pipette, die aus durchsichtigem Kunststoff bestand, konnten die adulten Tiere entfernt und in das neue Medium gesetzt werden. Anschließend wurden ca. ein bis sechs Nachkommen in die Pipette gesaugt, gezählt und in ein extra Gefäß mit Medium überführt. Zur Überprüfung, dass keine Nachkommen in der Photoschale übersehen wurden, wurde das restliche Medium in ein Becherglas überführt und gegen Licht gehalten, so dass eventuell noch im Medium befindliche Nachkommen gesehen werden konnten. Als Nachkommen wurden sowohl lebende als auch tote Tiere gewertet, sofern noch ein vollständiger Körper erkennbar war.

Die Nachkommenzahl eines Versuchskolbens wurde durch die Zahl der überlebenden Weibchen an diesem Tag geteilt.

In Versuchsreihe 2 und 3 wurden die Nachkommen nach der Zählung in einem Glaskolben überführt, der mit Medium und gleicher Huminstoffkonzentration wie im Ansatz, dem sie entstammten, gefüllt war. Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Kolben wieder in die Photoschale geschüttet und die Nachkommen mit der Pipette auf ein Kammerglas überführt. Unter dem Stereo-Mikroskop wurden anhand der 1. Antennen das Ge-

schlecht der Nachkommen und damit die Anzahl der weiblichen und männlichen Nachkommen bestimmt.

Sowohl die Photoschale und die Pipette als auch die Versuchskolben, die wieder mit Medium gefüllt und weiterverwendet wurden, wurden nach jeder Benutzung mit Leitungswasser gründlich gereinigt.

2.8 Statistik

Die Daten wurden in Microsoft Excel tabellarisch aufgeführt und als Diagramme dargestellt. Die Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde auch mit Microsoft Excel vorgenommen. Zur Ermittlung der Reproduktionsrate wurde nur mit der Zahl, der zu dem bestimmten Zeitpunkt noch lebenden Tieren gearbeitet, um den Einfluss der Lebensdauer zu minimieren.

Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde für den Lebensdauererster der logRank-Test, der im Internet zur Verfügung steht (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/index.html>⁴), verwendet. Zum Testen der Signifikanz der erhaltenden Reproduktionsraten und des Geschlechterverhältnisses der Nachkommen wurde das Programm SigmaStat 3,5 benutzt. Für die Signifikanz der Reproduktionsrate wurde der Test One Way ANOVA durchgeführt. Die Signifikanz des Geschlechterverhältnisses der Nachkommen wurde mit dem Chiquadrat-Test ermittelt.

3 Ergebnisse

In den vier Versuchsreihen wurden Daten bezüglich der Lebensspanne, der Reproduktionsrate und des Geschlechterverhältnis der Nachkommen erhoben.

3.1 Versuchsreihe 1

Abbildung 4 zeigt die Zahl der Überlebenden pro Tag und Ansatz aus Versuchsreihe 1. Im Durchschnitt wiesen die Versuchstiere der Kontrollgruppe eine geringere Überlebensrate als die Tiere mit Huminstoffexposition auf. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) bei 0,18 mmol/l DOC bzw. höchst signifikant ($p < 0,01$) bei den Ansätzen mit 0,54 mmol/l DOC und 1,08 mmol/l DOC.

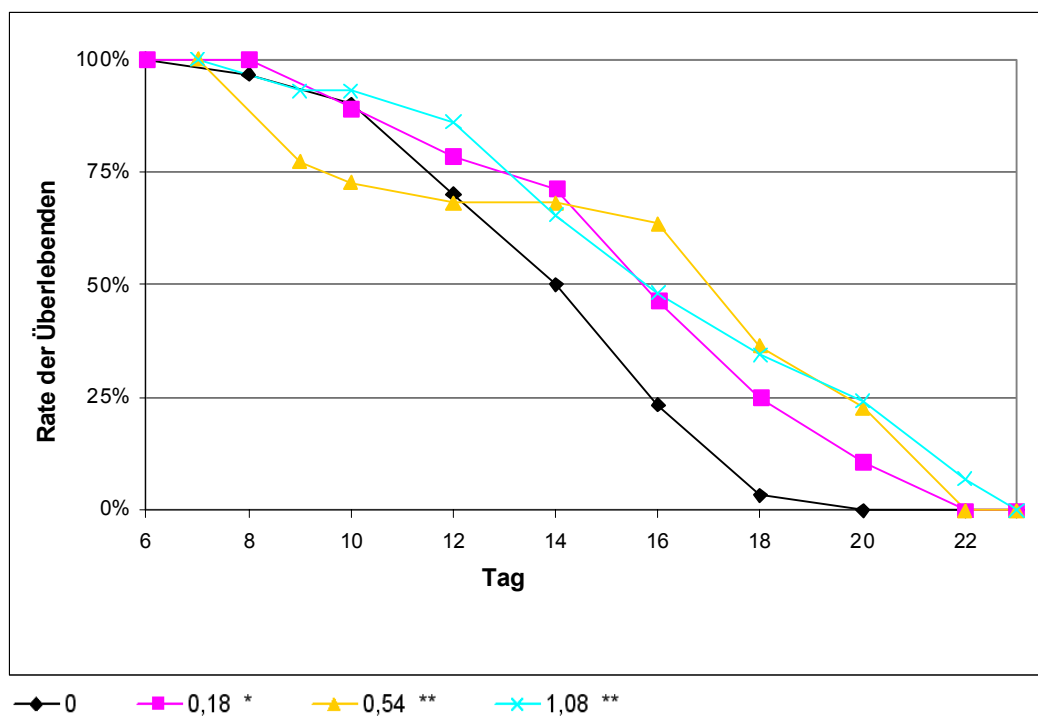


Abbildung 4: Überlebensrate weiblicher *M. macrocopa* in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$, Dauerlicht und 10 Tiere pro 100 ml, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

In der Anfangsphase (von Tag 6 bis 10) wurden die meisten toten Tiere im Ansatz mit der Huminstoffkonzentration von 0,54 mmol/l DOC gefunden. Nach zehn Versuchstagen waren hier ca. 70 % der Weibchen am Leben. In den anderen drei Ansätzen wurden zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede beobachtet. Ab dem 14. Versuchstag lebten in der Kontrollgruppe noch ca. 50 % der Ausgangstiere. Seit diesem Tag lag die Zahl der überlebenden Wasserflöhe in der Kontrollgruppe unter der Überlebensrate in den Ansätzen, denen HuminFeed zugesetzt wurde. In der Kontrollgruppe ist letzte Tier am 20. Versuchstag gestorben. In den Ansätzen mit einer Huminstoffkonzentration von 0,18 mmol/l DOC und 0,54 mmol/l DOC sind die letzten Weibchen an Versuchstag 22 gestorben. Die längste Lebensdauer mit 23 Tagen wurde bei einem Versuchstier in dem Ansatz mit der höchsten Huminstoffkonzentration (1,08 mmol/l DOC) festgestellt. Bei zwei Ansätzen (1,08 und 0,18 mmol/l DOC) wurde der Median am 16. Versuchstag erreicht, während beim Ansatz mit 0,54 mmol/l DOC Huminstoff am 18. Versuchstag weniger als 50 % der Ausgangstiere lebten. Auffällig ist weiterhin der Kurvenverlauf des Ansatzes mit 0,54 mmol/l DOC. Während die Überlebensrate in den anderen drei Ansätzen steil abfällt, ist beim Ansatz mit 0,54 mmol/l DOC von Tag 9 bis Tag 16 die Änderung in der Zahl der überlebenden Versuchstiere gering, so dass ein negativ sigmoider Verlauf zu erkennen ist.

Die geringste Lebensdauer im Durchschnitt wurde mit 14,10 Tagen bei der Huminstoffkonzentration von 0,54 mmol/l DOC gemessen, die sich kaum von der durchschnittlichen Überlebensrate der Weibchen in der Kontrollgruppe unterscheidet (14,13 Tage). Die höchste durchschnittliche Überlebensrate wurde bei einer Huminstoffkonzentration von 1,08 mmol/l DOC beobachtet. In diesem Ansatz lebten die Versuchstiere im Durchschnitt 15,97 Tage.

Durch eine hohe Sterberate in den ersten Versuchstagen unterscheidet sich die durchschnittliche Lebensdauer der Weibchen bei 0,54 mmol/l DOC kaum von der durchschnittlichen Lebensdauer in der Kontrollgruppe. Wird allerdings der Median und die maximale Lebensdauer betrach-

tet, weisen die Versuchstiere bei der Exposition mit 0,54 mmol/l DOC eine erhöhte Lebensdauer auf. Die Wasserflöhe in den anderen beiden Ansätzen, denen HuminFeed zugegeben wurde, zeigen sowohl im Durchschnitt, im Median als auch in der maximalen Lebensdauer eine Erhöhung zur Kontrollgruppe.

In Abbildung 5 ist die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei den verschiedenen Huminstoffkonzentrationen zu sehen. Im Ansatz mit 0,54 mmol/l DOC sind höchst signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ erzielt worden. Dieser Ansatz weist eine höhere Reproduktionsrate als die Versuchstiere der Kontrollgruppe auf.

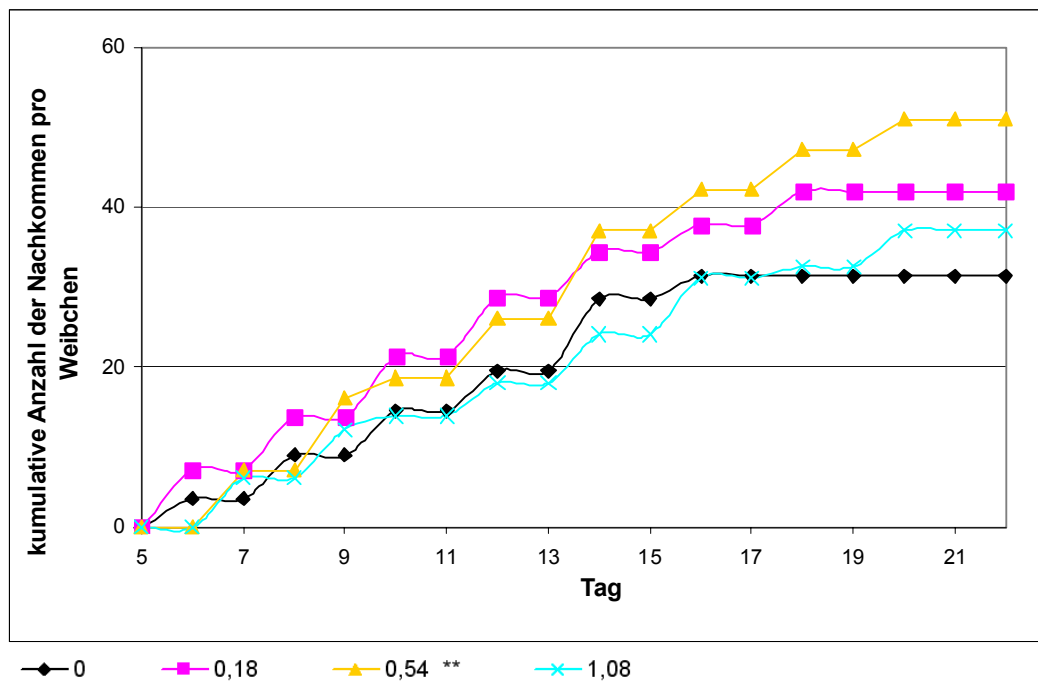


Abbildung 5: Reproduktionsrate von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei $T = 21\text{ °C}$, Dauerlicht und 10 Tiere pro 100 ml, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Der Ansatz, dem 1,08 mmol/l DOC zugesetzt wurde, unterscheidet sich hinsichtlich der Reproduktionsrate kaum von der Kontrollgruppe. Lediglich die erreichte Gesamtnachkommenzahl (37,09 Nachkommen pro Weibchen) liegt über der Gesamtnachkommenzahl des Ansatzes ohne Huminstoff (31,46 Nachkommen pro Weibchen), was allerdings auf die kürzere Lebensdauer in der Kontrollgruppe zurückzuführen ist. Die höchste Gesamtnachkommenzahl wurde mit durchschnittlich 50,99 Nachkommen

pro Weibchen beim Ansatz mit 0,54 mmol/l DOC gefunden, was eine Steigerung zur Kontrolle um ca. 62 % darstellt. Die Gesamtnachkommenzahl des Ansatzes mit 0,18 mmol/l DOC lag bei 41,98 Nachkommen pro Weibchen (Erhöhung um 1/3 im Verhältnis zur Kontrolle).

3.2 Versuchsreihe 2

In Abbildung 6 ist die durchschnittliche Nachkommenzahl pro Weibchen bei den verschiedenen Huminstoffkonzentrationen dargestellt. Signifikante Unterschiede sind nicht ermittelt worden. Allerdings liegt die Reproduktionsrate beim Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC ab Versuchstag 8 über der Kontrolle.

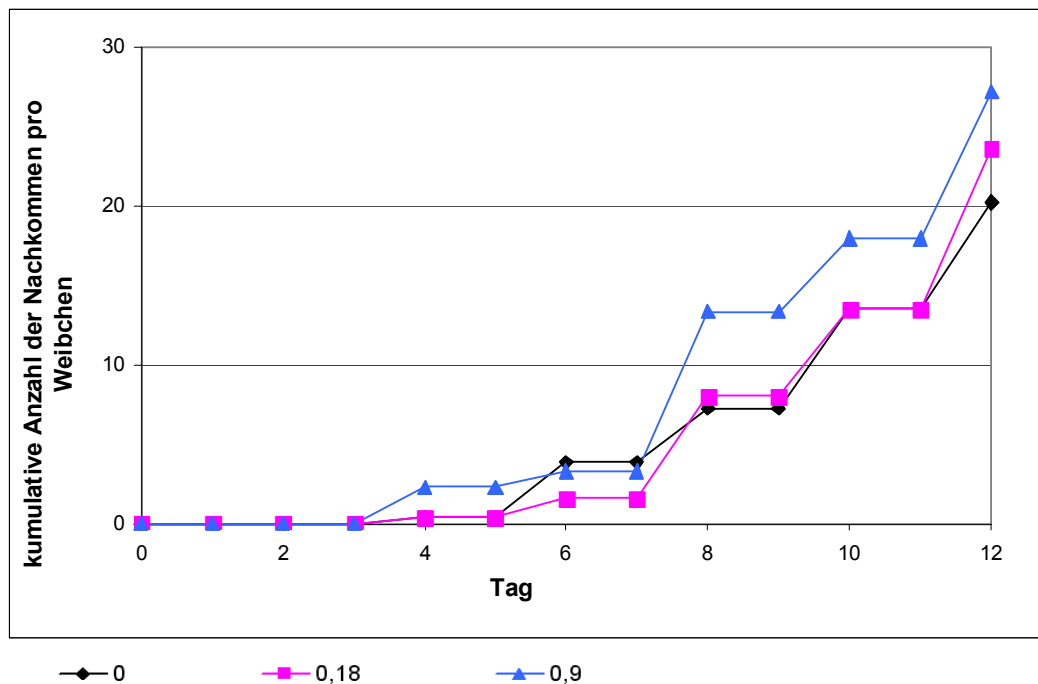


Abbildung 6: Reproduktionsrate von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei T = 26 °C, Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h und 10 Tiere pro 100 ml, * p < 0,05; ** p < 0,01

Die Kontrollgruppe und der Ansatz, dem 0,18 mol/l DOC zugegeben wurde, unterscheiden sich kaum bis auf die Gesamtnachkommenzahl. Diese liegt in der Kontrolle bei 20,18 Nachkommen pro Weibchen und beim Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC bei 23,55 Nachkommen pro Weibchen. Die höchste Gesamtnachkommenzahl wurde beim Ansatz mit 0,9 mmol/l

DOC ermittelt (27,11 Nachkommen pro Weibchen), was eine Steigerung um ca. 74 % bedeutet.

Abbildung 7 zeigt den prozentualen Anteil männlicher Nachkommen bei den verschiedenen Huminstoffkonzentrationen. Die Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede auf.

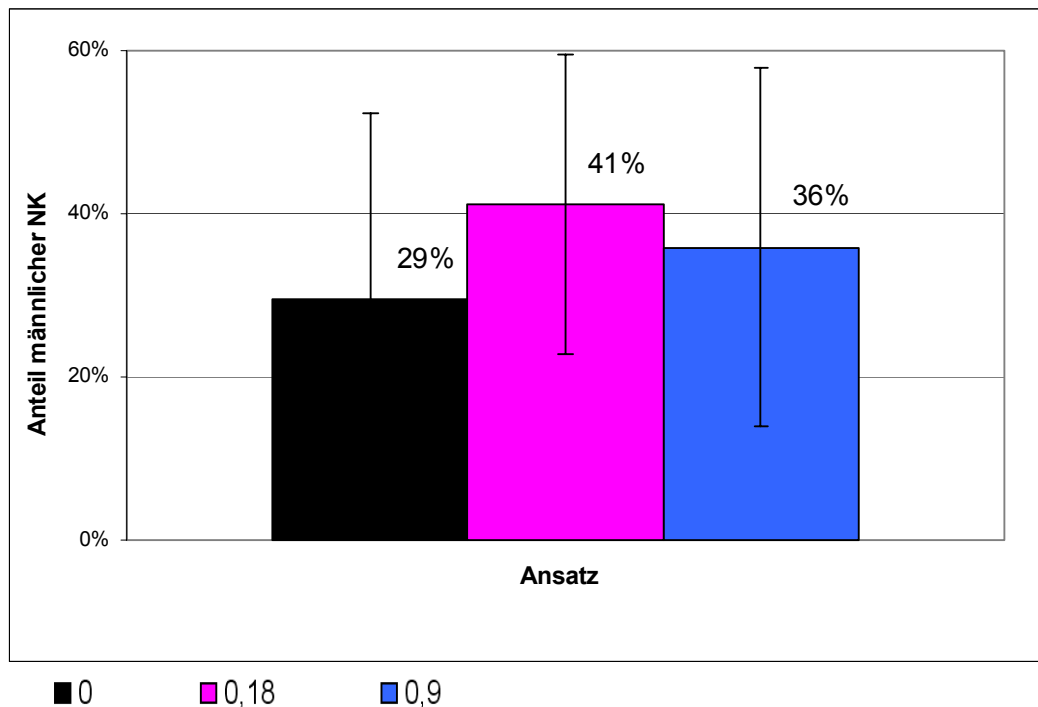


Abbildung 7: Anteil männlicher Nachkommen von *M. macrocopa* mit Standardabweichung in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei $T = 26\text{ °C}$, Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h und 10 Tiere pro 100 ml, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

In der Kontrollgruppe wurde der geringste Anteil an Männchen beobachtet. Hier machten männliche Nachkommen 29 % der gesamten Nachkommen aus. Mit 41 % wiesen die Nachkommen beim Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC die meisten Männchen auf. Bei 0,90 mmol/l DOC lag der prozentuale Anteil der männlichen Nachkommen mit 36 % zwischen den beiden anderen Ansätzen.

Der Anteil männlicher Nachkommen lag in beiden Ansätzen, die Huminstoff enthielten, tendenziell höher als in der Kontrollgruppe.

3.3 Versuchsreihe 3

Abbildung 8 zeigt die Zahl der Überlebenden pro Tag und Ansatz in Versuchsreihe 3 während des gesamten Versuches auf. Der Ansatz, der 0,90 mmol/l DOC Huminstoff enthielt, zeigt signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$). Er liegt bezüglich der Überlebensrate über der Kontrollgruppe. Die Überlebensrate im Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC liegt mit Ausnahme der letzten drei Versuchstage unter der Kontrolle.

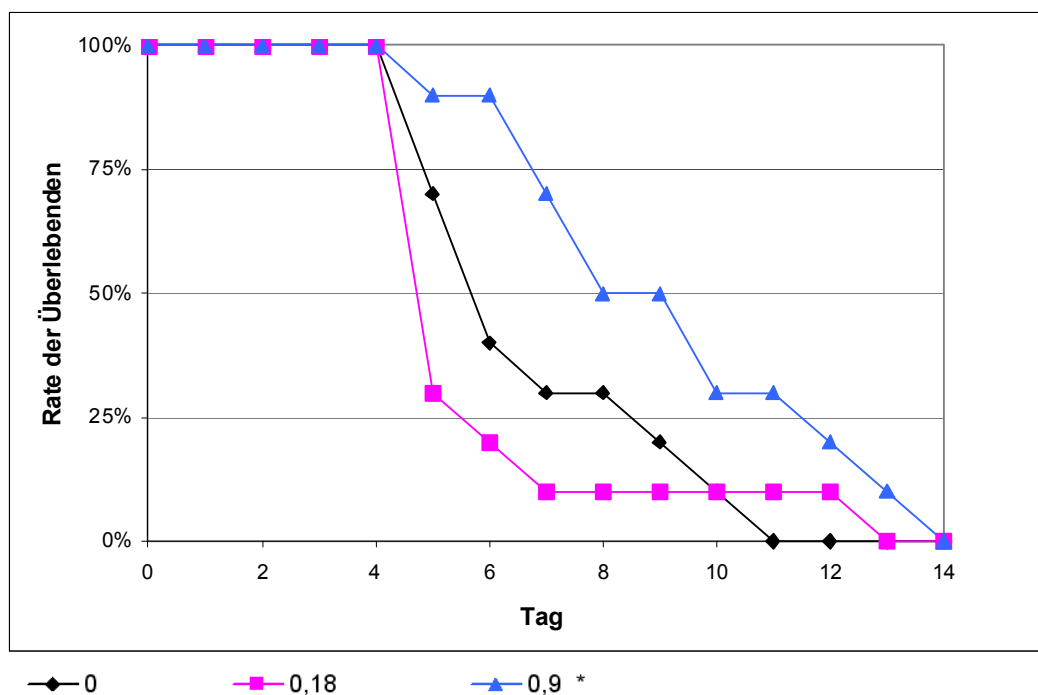


Abbildung 8: Überlebensrate weiblicher *M. macrocopa* in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei $T = 26\text{ °C}$, Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h und 1 Tier pro 100 ml, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Die Kontrollgruppe wies die kleinste maximale Lebensdauer mit 11 Tagen auf. Die größte maximale Lebensdauer wurde im Ansatz mit 0,90 mmol/l DOC gemessen (15 Tage). Der Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC Huminstoff zeigte eine maximale Lebensdauer von 14 Tagen.

Im Durchschnitt allerdings zeigten die Weibchen des Ansatzes mit 0,18 mmol/l DOC Huminstoff die geringste Lebensdauer mit 5,1 Tagen. Im Ansatz mit 0,90 mmol/l DOC wurden die Tiere im Durchschnitt mit 8,4 Tagen am ältesten. Die Kontrolltiere lagen mit einem Mittelwert von

6,0 Tagen mit ihrer Lebensdauer zwischen den beiden anderen Ansätzen.

Es zeigt sich also sowohl eine Erhöhung der maximalen Lebensdauer als auch der durchschnittlichen Lebensdauer im Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC im Verhältnis zur Kontrollgruppe, was auch die Überlebenskurve erkennen lässt.

Auffällig ist weiterhin der Kurvenverlauf vom Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC. An Versuchstag 5 wurden in diesem Ansatz 70 % der Weibchen tot aufgefunden. Bereits am 7. Versuchstag waren nur noch 10 % der Versuchstiere am Leben waren, danach allerdings war bis zum 14. Versuchstag keine Veränderung zu verzeichnen.

Abbildung 9 stellt die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei den verschiedenen Huminstoffkonzentrationen in Versuchsreihe 3 dar. Es wurden keine Signifikanzen festgestellt. Außerdem unterscheiden sich die Kurven aller drei Ansätze bis Versuchstag 10 kaum.

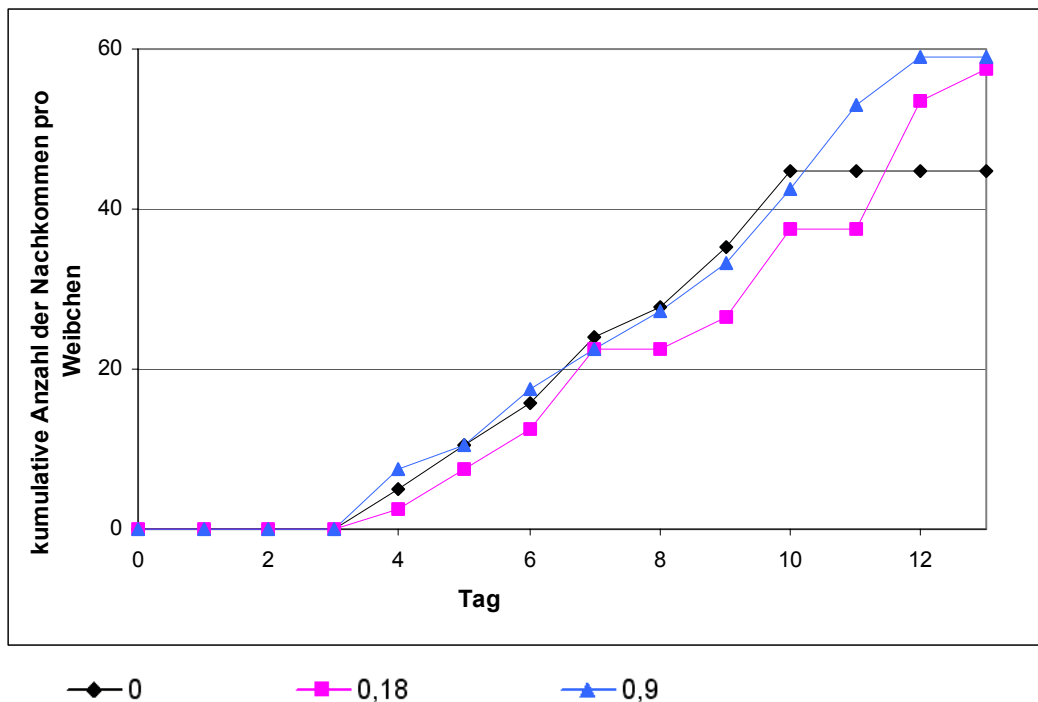


Abbildung 9: Reproduktionsrate von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei T = 26 °C, Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h und 1 Tier pro 100 ml, * p < 0,05; ** p < 0,01

Die höchste Gesamtnachkommenzahl pro Weibchen trat im Ansatz auf, der 0,90 mmol/l DOC Huminstoff enthielt (58,94 Nachkommen pro Weibchen). Die wenigsten Nachkommen mit durchschnittlich 44,83 Nachkommen hatten die Weibchen aus der Kontrollgruppe. Der Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC lag mit 57,60 Nachkommen nur gering unter dem Ansatz mit 0,9 mol/l DOC.

In Abbildung 10 ist aufgezeigt, wie hoch die Zahl der männlichen Nachkommen bei den verschiedenen Ansätzen aus Versuchsreihe 3 ist. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede gefunden.

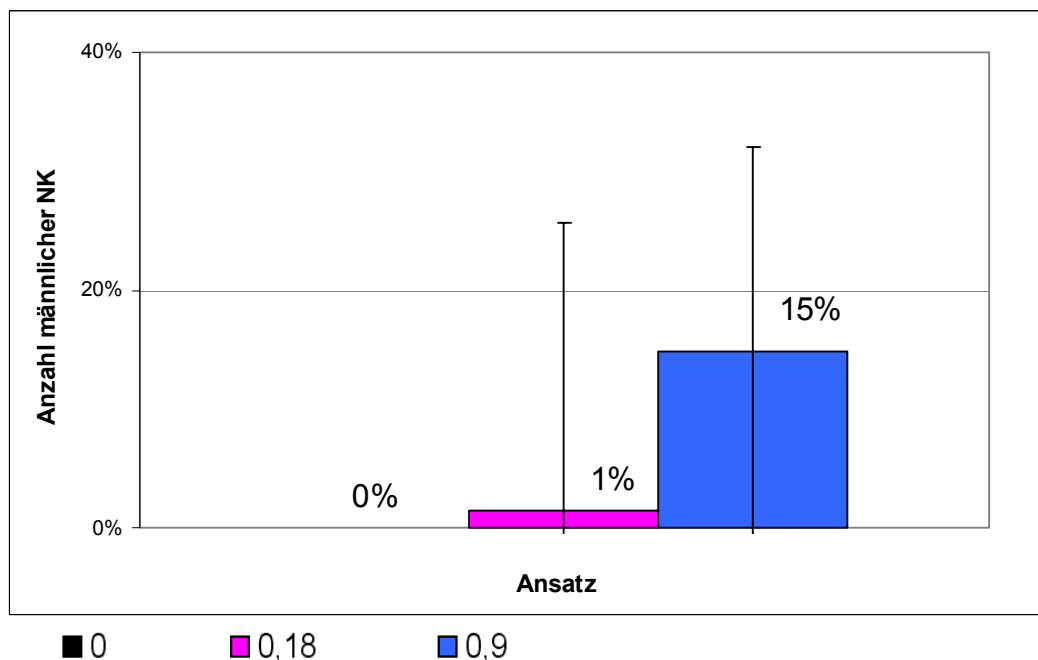


Abbildung 10: Anteil männlicher Nachkommen von *M. macrocopa* mit Standardabweichung in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei T = 26 °C, Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h und 1 Tier pro 100 ml, * p < 0,05; ** p < 0,01

In der Kontrollgruppe sind keine Männchen bei den Nachkommen aufgetreten. Im Ansatz mit 0,90 mmol/l DOC waren 15 % der Nachkommen männlich. Die Nachkommen im Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC Huminstoff gehörten zu 1 % zum männlichen Geschlecht.

Auffällig war, dass in der Kontrollgruppe kein einziges Männchen unter den Nachkommen gefunden wurde. Im Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC traten nur in einer einzigen Brut männliche Nachkommen auf (hier allerdings zu 69 %). Bei allen ersten Bruten der Weibchen im Ansatz mit 0,9 mmol/l

DOC sind nur weibliche Nachkommen aufgetreten. Männliche Nachkommen wiesen nur die zweiten bis vierten Bruten eines Weibchens in diesem Ansatz auf. Die jeweils letzte Brut eines Weibchens bestand wiederum nur aus Weibchen. Bei drei Weibchen im Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC bestand jeweils einmal eine komplette Brut aus Männchen.

3.4 Versuchsreihe Männchen

In Abbildung 11 ist die Zahl der Überlebenden pro Tag und Ansatz männlicher *M. macrocopa* bei unterschiedlichen Huminstoffkonzentrationen aufgeführt. Es sind allerdings keine Signifikanzen gefunden worden. Die Überlebensrate im Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC ist leicht erhöht im Verhältnis zur Kontrolle und zum Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC. Die Kontrollgruppe und der Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC unterscheiden sich kaum voneinander.

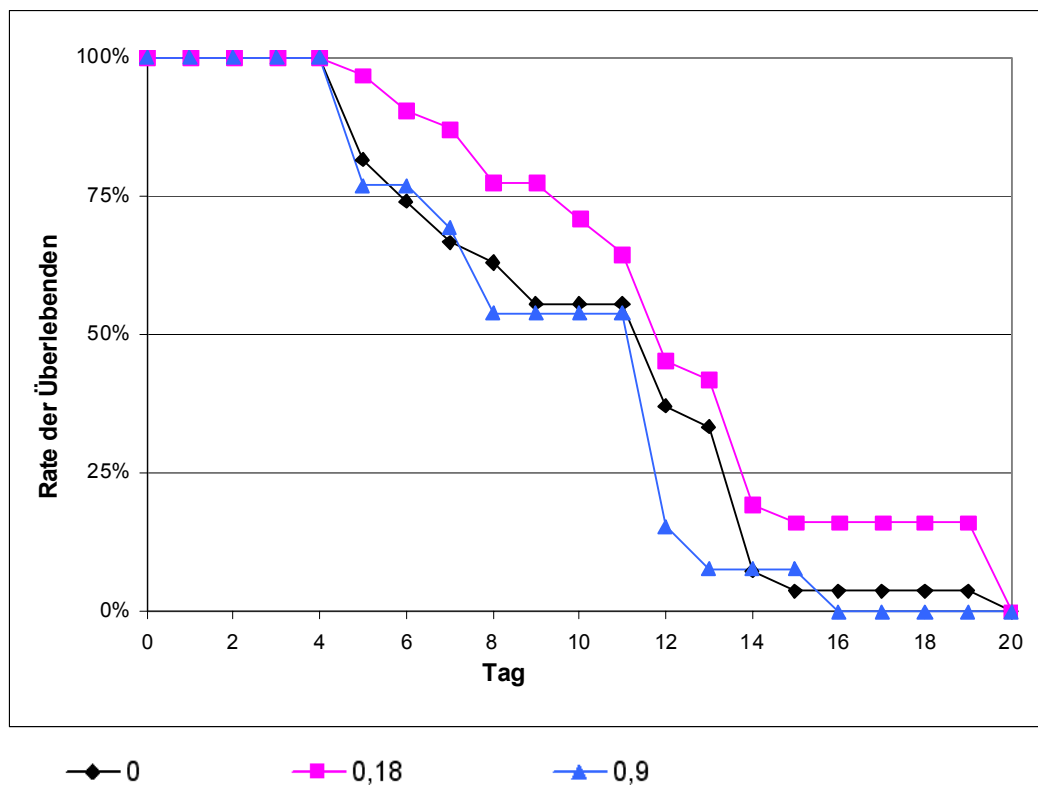


Abbildung 11: Überlebensrate männlicher *M. macrocopa* in Abhängigkeit von der HuminFeed-Konzentration [mmol/l DOC] bei T = 26 °C, Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h und 10 Tiere pro 100 ml, * p < 0,05; ** p < 0,01

Die geringste Lebensdauer zeigten im Durchschnitt die Männchen im Ansatz mit 0,90 mmol/l DOC Huminstoff mit 8,77 Tagen. Die Tiere im Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC lebten im Durchschnitt mit 10,90 Tagen am längsten. Die Kontrolltiere liegen mit ihrer durchschnittlichen Lebensdauer (9,78 Tage) zwischen den beiden Ansätzen mit Huminstoff im Medium.

Die maximale Lebensdauer wurde im Ansatz mit 0,9 mmol/l am 16. Versuchstag vier Tage eher als bei den beiden anderen Ansätzen erreicht (maximale Lebensdauer = 20 Tage).

4 Diskussion

Zum Thema Stress und seine Auswirkungen gibt es unzählige Versuche und Ansätze von unterschiedlichsten Wissenschaftlern. Stress wird als ein Ereignis (physikalisch, chemisch, biologisch) definiert, welches auf die Homöostase eines Organismus wirkt (Moberg 1975, Rattan 2004, Calabrese & Baldwin 2001), dem internen Gleichgewicht eines biologischen Systems, das zum effizienten Funktionieren dieses Systems notwendig ist (Schaefer 2003 S. 141, Rattan 2004). Zu den Auswirkungen von Stress auf Organismen sind verschiedene Theorien aufgestellt worden (u.a. disposable soma theory, hormesis theory und multiple stress resistance oder auch cross tolerance genannt), auf deren Aussagen später näher eingegangen wird.

Da von der allgemeinen Eigenschaft von **Huminstoffen**, in exponierten aquatischen Organismen Stressreaktionen hervorzurufen, ausgegangen werden kann (Steinberg et al. 2003, 2008), braucht im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal bestätigt zu werden. Vielmehr stehen die Auswirkungen derartiger Stressreaktionen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Denn neben den genannten Stressreaktionen exponierter Organismen sind auch positive Effekte festgestellt worden. Huminstoffe können in direkter und indirekter Weise auf Organismen wirken (Steinberg et al. 2006). Sie können hormonähnliche Wirkung besitzen, mit Zellbestandteilen interagieren und dadurch sowohl Stress auslösen als auch einen Schutzmechanismus darstellen (Steinberg et al. 2008, Prokhotskaya & Steinberg 2007, Steinberg et al. 2007, Meinelt et al. 2001, Timofeyev et al. 2007). Die Wirkung als Stressor wird insbesondere auf biochemischer Ebene deutlich. U.a. wird bei Aufnahme von Huminstoffen die hsp-Synthese und andere Anti-Stress-Reaktionen im Organismus gesteigert (Steinberg et al. 2006, 2007). Der biochemische Aspekt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Wasserflöhe pflanzen sich parthenogenetisch fort und produzieren in der Regel nur unter ungünstigen oder extremen Umweltbedingungen Männchen (Gruner: Lehrbuch der Speziellen Zoologie, S. 570; Zadereev & Lopatina 2006), damit Dauereier durch sexuelle Befruchtung gebildet werden können (Forró et al. 2008). Sie stellen persistente Dauerformen dar (Schaefer: Wörterbuch der Ökologie, S. 73). Das Produzieren von Ehipipien erhöht die Chance, dass bei besseren Bedingungen eine neue Population anhand der Dauereier aufgebaut werden kann. Ist die prozentuale Anzahl der männlichen Nachkommen erhöht, kann davon ausgegangen werden, dass sie durch Stress verursacht ist. Ob der zugesetzte Huminstoff als Stressor wirkte, kann somit nicht nur über biochemische Parameter, sondern auch unter Einbeziehung des Geschlechterverhältnisses der Nachkommen festgestellt werden.

In Versuchsreihe 2 und 3 ist die Anzahl der männlichen Nachkommen im Verhältnis zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 7 und 10). Allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant. Der relativ hohe Anteil von Männchen bei den Nachkommen der Kontrollgruppe in Versuchsreihe 2 (Abbildung 7) lässt darauf schließen, dass auch die Versuchstiere gestresst waren. Der Stress könnte unter anderem als mechanischer Stress beim Umsetzen oder auch als Dichtestress vorhanden gewesen sein.

Eine weitere Erklärung für das erhöhte Auftreten männlicher Nachkommen in Versuchsreihe 2 und 3 (Abbildung 7 und 10) kann auch in der Hormon ähnlichen Wirkung von Huminstoffen liegen (Meinelt et al. 2004, Höss et al. 2001). Olmstead & LeBlanc (2007) haben gezeigt, dass die Geschlechterdetermination durch Umweltfaktoren über chemische Stoffe bei *D. magna* stattfindet. Zadereev & Lopatina (2006) erzielten jedoch Ergebnisse, die darauf schließen lassen, dass das Umstellen von der Parthenogenese auf die sexuelle Reproduktion weniger von chemischen Substanzen als von der Individuendichte abhängt.

Im Folgenden wird versucht, die eingangs erwähnten Theorien über

Stressauswirkungen auf die gewonnenen Ergebnisse anzuwenden und zu diskutieren.

Die „**disposable soma theory**“, besagt, dass die vorhandenen Ressourcen eines Individuums, die nicht für allgemeine metabolische Prozesse verwendet werden, dem somatischen Erhalt und der Reproduktion dienen und zwischen diesen beiden verteilt werden (Holliday 2004). Langlebige Arten scheinen bessere Abwehrmechanismen gegen eine Vielzahl von Stressoren zu besitzen, so dass auch bei Stress der somatische Erhalt optimiert ist. Allerdings ist die Reproduktionsrate bei langlebigen Arten im Verhältnis zu anderen Spezies verringert (Kirkwood et al. 2000). Die Erhöhung des somatischen Erhalts erfolgt auf Kosten der Reproduktion und umgekehrt (Kirkwood 1977; Kirkwood & Austad 2000, Fowler & Partridge 1989, Tatar & Promislow 1997).

In den Ansätzen, denen Huminstoff zugesetzt wurde, zeigte sich keine reziprok-proportionale Abhängigkeit der Lebensdauer von der Reproduktionsrate. In Versuchsreihe 1 (Ansätze mit 0,18 mmol/l, 0,54 mmol/l und 1,08 mmol/ DOC) und in Versuchsreihe 3 (0,9 mmol/l DOC) wurden signifikante lebensverlängernde Effekte erzielt (Abbildung 4 und 8). In diesen Ansätzen waren jedoch keine negativen Veränderungen in der Reproduktionsrate ersichtlich (Abbildung 5 und 9). Vielmehr trat bei den meisten Ansätzen eine Erhöhung der Reproduktionsrate auf (Abbildung 5 und 9), die sich in Versuchsreihe 1 bei einer Konzentration von 0,54 mmol/l DOC als signifikant erwies (Abbildung 5). Die hier erhaltenen Ergebnisse können daher die Annahme der „disposable soma theory“ nicht bestätigen.

Die Gesamtnachkommenzahl ist in Versuchsreihe 3 (Abbildung 9) im Verhältnis zur Versuchsreihe 1 (Abbildung 5) in allen Ansätzen um ca. 50 % erhöht. Dies liegt natürlich auch darin begründet, dass in Versuchsreihe 1 die Daten erst ab dem 6. Versuchstag verwendet wurden.

Allerdings wird sich auch die **Erhöhung der Temperatur** von 21 °C auf 26 °C positiv auf die Reproduktionsrate auswirken (Bunioto & Arcifa

2007). Die Erhöhung der Temperatur ging in Versuchsreihe 3 in allen Ansätzen mit einer Verringerung der Lebensdauer um ca. 45% (0,18 mmol/l DOC) bis 50% (Kontrolle) einher (Abbildung 4 und 8). Die Daten könnten daher ein Indiz für die „disposable soma theory“ sein.

Hormesis ist das Phänomen, dass milder Stress zu vorteilhaften Effekten (anti-aging und life-prolonging) für Zellen und für den Organismus führt (Rattan 2004). Bestimmte Substanzen, die in höheren Konzentrationen schädlich für den Organismus sind, rufen in geringen Konzentrationen den Hormesis-Effekt hervor (Rattan 2004, Cypser & Johnson 2002, Minois 2000, Calbrese & Baldwin 2003 a, b). Stressoren lösen sowohl positive als auch negative Effekte aus. Wenn sie im Gesamtergebnis jedoch netto-positiv erscheinen, handelt es sich um den Hormesis-Effekt (Sørensen et al. 2007). Versuche mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* Maupas (Steinberg et al. 2007), dem Wasserfloh *Daphnia magna* Straus (Euent et al. 2008) und *Drosophila melanogaster* Meigen (Hercus et al. 2003) haben gezeigt, dass milder Stress sich positiv auf die Darwinsche Fitness (z.B. Lebensdauer und Reproduktionsrate) der untersuchten Organismen auswirken können.

In Versuchsreihe 1 konnte in allen drei Ansätzen, denen Huminstoff zugesetzt wurde, eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne im Verhältnis zu den Kontrolltieren festgestellt werden (Abbildung 4). Die hohe Anfangssterblichkeit im Ansatz mit 0,54 mmol/l DOC könnte durch einen Experimentierfehler hervorgerufen worden sein. Auch hinsichtlich der Reproduktion sind positive Effekte in den Ansätzen mit Huminstoffen erzielt worden (Abbildung 5). Im Ansatz mit 0,54 mmol/l DOC liegt die Reproduktionsrate signifikant über der Kontrollgruppe. Die anderen beiden Ansätze (0,18 mmol/l und 1,08 mmol/l DOC) zeigen keine signifikanten Unterschiede, liegen allerdings bezüglich der Gesamtnachkommenzahl über der Kontrolle.

Die Ergebnisse sprechen daher dafür, dass hormetische Effekte durch HuminFeed in den verwendeten mittleren Konzentrationen aufgetreten

sind und diese sich sowohl als lebensverlängernd als auch durch die Erhöhung der Reproduktionsrate äußern. Dieses Ergebnis ist darüber hinaus nicht konsistent mit der disposable soma theory.

Auch in Versuchsreihe 3 konnten signifikante lebensverlängernde Effekte beim Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC festgestellt werden (Abbildung 8). Calabrese & Baldwin (2003 a, b) gehen davon aus, dass Stressreaktionen nicht linear abhängig von der Konzentration der schädlichen Substanz sind, sondern als Funktion eine u-Form annehmen. Diese Annahme wird durch die in Versuchsreihe 2 (Abbildung 8) erzielten Ergebnisse unterstützt. Der Ansatz mit der geringeren Konzentration an Huminstoff unterschied sich nicht wesentlich von der Kontrollgruppe, während im Ansatz mit 0,9 mmol/l DOC eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer aufgetreten ist.

Die lebensverlängernde Wirkung von Huminstoffen kann auf deren chemische Struktur zurückgeführt werden. Huminstoffe leiten sich u.a. von **Polyphenolen** wie Ligninen und Tanninen ab (Leenheer & Rostad 2004). Von Polyphenolen ist bekannt, dass sie lebensverlängernde Wirkung besitzen und die Stressresistenz erhöhen (Leenheer & Rostad 2004, Pietsch et al. 2008). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass sie als spontane Antioxidantien wirken (Moure et al. 2001) die Sauerstoff-Radikale abbauen und unschädlich machen, was die Zell-Beschädigung vermindert und somit die lebensverlängernde Wirkung hervorruft. Daher ist anzunehmen, dass die Verlängerung der Lebensdauer durch Huminstoffe auf deren polyphenolischen Bestandteile beruht.

Außerdem scheinen Polyphenole auf Transkriptionsfaktoren zu wirken. In Versuchen mit Quercetin, einem Polyphenol der Untergruppe Flavonoide, wurde u.a. diese Annahme bestätigt (Pietsch et al. 2008). Transkriptionsfaktoren wie z.B. *daf-2*, *daf-16* und *age-1* beeinflussen die Reproduktionsrate und/oder die Lebensdauer eines Organismus (Pietsch et al. 2008, Gems & McElwee 2003, Yoshinaga et al. 2005). Bei Aktivierung des Transmembran-Rezeptors IGF-1 wird der Transkriptions-Rezeptor *daf-16*

deaktiviert. Dieser stimuliert, wenn er aktiv ist, die Bildung von heat-shock-proteins, antioxidantischen Enzymen und anderen Proteinen und fördert damit die Verlängerung der Lebensdauer. Seine Deaktivierung durch IGF-1 führt zu Proteinbildungen, die eine erhöhte Reproduktion und eine verringerte Lebensdauer bedingen (Gems & McElwee 2003, Yoshinaga et al. 2003). Wenn Huminstoffe deaktivierend auf den Rezeptor IGF-1 und aktivierend auf *daf-16* wirken, können sie die Verlängerung der Lebensdauer hervorrufen.

Die festgestellte Verlängerung der Lebensdauer bei *M. macrocopa* durch Zugabe eines Huminstoffes konnte bei Versuchen mit *D. magna* nicht bestätigt werden (Euent et al 2008, Bouchnak & Steinberg in prep.). Wurde *P. subcapitata* als Futteralge verwendet, verkürzte sich die Lebensdauer der weiblichen Tiere, wenn das Medium Huminstoff enthielt. Bei *D. magna*-Männchen trat dagegen eine Lebensverlängerung auf (Euent et al. 2008).

Im Gegensatz zu diesen Versuchen konnte bei *M. macrocopa* keine Geschlechter-spezifische Veränderung der Lebensdauer durch Huminstoffe beobachtet werden. Sowohl die Weibchen als auch die Männchen zeigten lebensverlängernde Effekte bei Zugabe von Huminstoffen zum Medium. Die unterschiedliche Reaktion der Wasserflöhe auf Huminstoffe könnte auf deren verschiedenen Lebensräume zurückzuführen sein. Tropische Wasserflöhe (z.B. *M. micrura* Kurz) kommen oft in Huminstoff reichen Gewässern vor. Aus diesem Grund könnten sich Huminstoffe positiv deren Darwinsche Fitness auswirken.

Eine weitere Theorie, die sich mit den Auswirkungen von Stress befasst, ist die „**multiple stress resistance theory**“ (auch cross-tolerance oder acclimation phenomenon genannt). Selye (1970) hat das Postulat aufgestellt, dass jeglicher Stress eine generelle und nicht spezifische physiologische Antwort provoziert (general adaptive syndrome). Diese beinhaltet thermoregulatorische Prozesse, Apoptose, DNA-Reparatur-Prozesse, Detoxifikation, Synthese von heat shock proteins (hsp) und Antioxidantien

(Rattan 2004). War ein Organismus einem Stressor ausgesetzt, führt dies durch das general adaptive syndrome zu einer mittleren Resistenz auch gegenüber anderen Stressoren (Cypser & Johnson 2002). In verschiedenen Versuchen u.a. mit *Moina* und anderen Wasserflöhen wurde ermittelt, dass ab einer bestimmten Individuendichte insbesondere der gleichen Art der sogenannte Dichtestress auf die Tiere wirkt (Zadereev & Lopatina 2007, Martínez-Jerónimo et al. 2007). Dieser Dichtestress könnte auch in Versuchsreihe 1 und der vorangegangenen Biomassezucht auf die Tiere gewirkt haben, da hier 10 Individuen in 100 ml Medium gehalten wurden. Die dadurch induzierte Stress-Reaktion könnte zur multiplen Stress-Resistenz geführt haben, so dass die Versuchstiere auch an den Stress, der durch den Huminstoff im Medium ausgelöst wurde, relativ gut adaptiert waren (Rattan 2004). Das würde erklären, warum nur in Versuchsreihe 1 eine signifikante Verlängerungen der Lebensdauer (Abbildung 4) bei den Ansätzen, die Huminstoff enthielten aufgetreten ist. Durch die multiple Stress-Resistenz waren die hormetischen Effekte stärker ausgeprägt.

Auffällig ist weiterhin, dass in Versuchsreihe 3 der Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC eine hohe Anfangssterblichkeit aufweist (Abbildung 8). Die Kontrollgruppe weist eine Überlebenskurve auf, die dem Idealtyp II (Überlebensrate variiert nicht mit dem Alter) oder auch theoretische Kurve genannt entspricht (Odum 1983 S. 272, Wittig & Streit 2004 S. 40). Im Ansatz mit 0,18 mmol/l DOC in Versuchsreihe 1 verändert sich die Überlebenskurve annähernd zum Idealtyp III (viele Nachkommen, aber hohe Anfangssterblichkeit) oder auch als konkave Kurve bezeichnet (Odum 1983 S. 272, Wittig & Streit 2004 S. 40). In anderen Ansätzen ist eine eindeutige Veränderung der Überlebenskurve hin zu einem anderen Idealtyp nicht zu erkennen. Es bleibt daher fraglich, ob die Veränderung in der Überlebenskurve von Versuchsreihe 3 durch den Huminstoff hervorgerufen wurde.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass Huminstoffe als Stressoren anzusehen sind. In geringen Konzentrationen wirken sie je-

doch lebensverlängernd und erhöhen die Reproduktionsrate (Hormesis) von *M. macrocopa*. Besonders eindeutige Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Dichtestress erzielt, was ein Hinweis auf eine multiple Stress-Resistenz ist.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christian E. W. Steinberg und seinen Kollegen der Arbeitsgruppe Gewässer- und Stressökologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität in Berlin für die sehr gute Betreuung und die Hilfestellung, die mir während der praktischen Versuch und der schriftlichen Ausarbeitung dieser Bachelorarbeit zuteil wurden.

Weiterhin danke ich Albert Suhett und Jayme Santangelo, Laboratório de Limnologia, UFRJ, Rio de Janeiro, - dafür, dass sie mir einen Teil der von ihnen isolierten Wasserflöhe *Moina macrocopa* für Versuche zur Verfügung gestellt haben und bereit waren, mir Informationen über diese Wasserfloh-Art, deren Isolierung und Standort zukommen zu lassen. Auch die Diskussionen mit den anderen Studierenden in der Arbeitsgruppe Gewässer- und Stressökologie waren angenehm und hilfreich für das Erstellen meiner Arbeit.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und meinem Lebensgefährten für die seelische und praktische Unterstützung.

Literaturverzeichnis

Standard- und Bestimmungswerke

- Brohmer P., Schaefer M. (2006): Fauna von Deutschland, 22. Auflage, Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co., Wiebelsheim
- Gruner H.-E. (1993): Lehrbuch der Speziellen Zoologie Band I: Wirbellose Tiere 4. Teil: Arthropoda (ohne Insecta), 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart – New York
- Hoffmann A. A., Parsons P. A. (1991): Evolutionary genetics and environmental stress, 1. Auflage, Oxford University Press, Oxford
- Munk K. (2002): Grundstudium Biologie - Zoologie, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin
- Odum E. P. (1983): Grundlagen der Ökologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart -New York
- Schaefer M. (2003): Wörterbuch der Ökologie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin
- Storch V., Welsch U. (2004): Systematische Zoologie, 6. Auflage, Elsevier GmbH, München
- Wittig R., Streit B. (2004): Ökologie, 1. Auflage,

Zeitschriften

- Bouchnak R.,
Steinberg C.E.W. (in prep.): *Daphnia magna* Straus: multiple stress and longevity. *Limnologica*
- Bunioto T. C.,
Arcifa M. S. (2007): Effects of food limitation and temperature on cladocerans from a tropical Brazilian lake, *Aquatic Ecology*, 41: 569 - 578
- Calabrese E. J.,
Baldwin L. A. (2001): Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis, *Critical Reviews in Toxicology*, 31: 353 - 424
- Calabrese E. J.,
Baldwin L. A. (2003a): Toxicology rethinks its central belief, *Nature*, 421: 691 - 692
- Calabrese E. J.,
Baldwin L. A. (2003b): Hormesis: the dose-response revolution, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43: 175 - 197
- Calabrese E. J.,
Blain R. (2005): The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview, *Toxicology and Applied Pharmacology*: 280 - 301
- Cypser J. R.,
Johnson T. E. (2002): Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 57: B109 – B114
- Euent S., Menzel R.,
Steinberg C. E. W. (2008): Gender-specific lifespan modulation in *Daphnia magna* by dissolved humic substances preparation, *Annals of Environmental Science*, 2: 7 - 10
- Farjalla F. V.,
Amado A. M.,
Suhett A. L. (2008): Humic Substances – Part3: Reviewing DOC removal paradigms in highly humic aquatic ecosystems,

Environmental Science and Pollution
Research, in press

- Feder M. E.,
Hofmann G. E. (1999):
Heat-shock proteins, molecular chaperons,
and the stress response: evolutionary and
ecological physiology,
Annual Review of Physiology, 61: 243 - 282
- Forró L., Korovchinsky N. M.,
Kotov A. A., Petrussek A. (2008):
Global diversity of cladocerans
(Cladocera;Crustacea) in freshwater,
Hydrobiologia, 595: 177 - 184
- Fowler K.,
Partridge L. (1989):
A cost of mating in female fruit flies,
Nature, 338: 760 – 761
- Gems D.,
McElwee J. J. (2003):
Microarraying mortality,
Nature, 424: 259 - 261
- Hercus M. J., Loeschcke V.,
Rattan S. I. S. (2003):
Lifespan extension of *Drosophila
melanogaster* through hormesis by re-
peated mild heat stress,
Biogerontology, 4: 149 – 156
- Höss S., Bergtold M.,
Haitzer M., Traunspurger W.,
Steinberg C.E.W. (2001):
Refractory dissolved organic matter
can influence the reproduction of
Caenorhabditis elegans (Nematode),
Freshwater Biology, 46: 1-10
- Holliday R. (2004):
Aging: the reality – the multiple and irre-
versible causes of aging,
Journals of Gerontology: Biological Sci-
ences, Vol. 59A, No. 6: 568 - 572
- Kirkwood T. B. L. (1977):
Evolution of ageing,
Nature, 270: 301 - 304
- Kirkwood T. B. L.,
Austadt S. N. (2000):
Why do we age?
Nature, 408: 233 - 238
- Kirkwood T. B. L.,
Kapahi P.,
Shanley D. P. (2000):
Evolution, stress and longevity
Journal of Anatomy, 197: 587 - 590

- Klüttgen B., Dülmer U.,
Engels M., Ratte H. (1994):
ADaM, an artificial freshwater for the
culture of zooplankton,
Water Research, 28: 743 - 746
- Laugero K. D.,
Moberg G. P. (2000):
Summation of behavioral and
immunological stress: metabolic
consequences to the growing mouse,
American Journal of Physiology
Endocrinology and Metabolism,
279: 44 – 49
- Leenheer J. A.,
Rostad C. E. (2004):
Tannins and terpenoids as major
precursors of Suwannee River fulvic acids,
U.S. Geological Survey Scientific
Investigations Report, 1004 – 5276: 16p
- Martínez-Jerónimo F.,
Rodríguez-Estrada J.,
Villaseñor-Córdova R. (2007):
Effect of culture density and volume
on *Moina micrura* (Kurz, 1874),
reproduction and sex ratio in the progeny,
Hydrobiologia, 594: 69 - 73
- Meinelt T., Playle R.,
Schreckenbach K.,
Pietroock M. (2001):
Humic substances and the water calcium
content change the toxicity of the
antiparasitic mixture,
Aquaculture Research, 32: 1-8
- Meinelt T., Schreckenbach K.,
Knopf K., Wienke A., Stüber A.,
Steinberg C.E.W. (2004):
Humic substances increase the constitution
of swordtail (*Xiphophorus helleri*),
Aquatic Science, 66: 239 – 245
- Meinelt T., Schreckenbach K.
Pietroock M., Heidrich S.,
Steinberg C. E. W. (2008):
Humic substances (review series), Part 1:
Dissolved humic substances (HS) in
aquaculture and ornamental fish breeding,
Environmental Science and Pollution
Research, 15 (1): 17 - 22
- Minois N. (2000):
Longevity and aging: beneficial effects of
exposure to mild stress,
Biogerontology, 1: 15 - 29
- Moberg G. P. (1975)
Effects of environment and management
stress on reproduction on the dairy cow,
Journal of Dairy Science,
Vol. 59, No. 9: 1618 – 1624

- Muñoz-Mejía G.,
Martínez-Jerónimo F. (2007):
Impact of algae and their concentrations on the reproduction and longevity of cladocerans,
Annales de Limnologie – International Journal of Limnology, 43 (3): 167 - 177
- Moure A., Cruz J. M.,
Franco D., Dominguez J. M.,
Sineiro J., Dominguez H.,
Núñez M. J., Parajó J. C. (2001) :
Natural antioxidants from residual sources,
Food Chemistry,
72 (2) : 145 - 171
- Nicklisch A, Shatwell T.,
Köhler J. (2008):
Analysis and modelling of the interactive effects of temperature and light on phytoplankton growth and relevance for spring bloom,
Journal of Plankton Research, 30: 75 - 91
- Olmstead A. W.,
LeBlanc G. A. (2007):
The Environmental-Endocrine Basis of Gynandromorphism (Intersex) in a Crustacean,
International Journal of Biological Sciences, 3: 77 – 84
- Petrusek A. (2002):
Moina (Crustacea: Anomopoda, Moinidae) in the Czech Republic: a review,
Acta Societatis zoologicae Bohemicae 66: 213 – 220
- Petrusek A., Černý M.,
Audenaert E. (2004):
Large intercontinental differentiation of *Moina micrura* (Crustacea: Anomopoda): one less cosmopolitan cladoceran?,
Hydrobiologia, 526: 73 - 81
- Pietsch K., Saul N.,
Menzel R., Stürzenbaum S. R.,
Steinberg C. E. W. (2009):
Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age-1*, *daf-2*, *sek-1* and *unc-43*,
Biogerontology,
doi:10.1007/s10522-008-9199-6
- Prokhotskaya V. Y.,
Steinberg C. E. W. (2007):
Differential Sensitivity of a coccal green algal and a cyanobacterial species to dissolved organic matter (NOM),
Environmental Science and Pollution Research, 14 SI, 11 - 18
- Rattan S. I. S. (2004):
The future of aging interventions – Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis,

- Sanders B. M. (1993): Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective, *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 49 - 75
- Selye H. (1970): Stress and aging, *Journal of the American Geriatrics Society*, 18: 669 – 680
- Sørensen J. G., Kristensen T. N., Kristensen K. V., Loeschcke V. (2007): Sex specific effects of heat induced hormesis in Hsf-deficient *Drosophila melanogaster*, *Experimental Gerontology*, 42: 1123 - 1129
- Steinberg C. E. W., Brüggemann R. (2002): Research Paper – Ambiguous ecological control by dissolved humic matter (DHM) and natural organic matter (NOM): Trade-offs between specific and non-specific effects, *Acta hydroChimica et hydroBiologica*, Vol. 29 (6 – 7): 399 - 411
- Steinberg C. E. W., Kamara S., Prokhotskaya V. Y., Manusadžianas L., Karasyova T. A., Timofeyev M. A., Jie Z., Paul A., Meinelt T., Farjalla V. F., Matsuo A. Y. O., Burnison B. K., Menzel R. (2006): Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level?, *Freshwater Biology*, 51: 1189 – 1210
- Steinberg C. E. W., Saul N., Pietsch K., Meinelt T., Rienau S., Menzel R. (2007): Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, *Annals of Environmental Science*, 1: 81 – 90
- Steinberg C. E. W., Meinelt T., Timofeyev M. A., Bittner M., Menzel R. (2008): Humic substances (review series) – Part 2: Interactions with Organisms, *Environmental Science and Pollution Research*, 15 (2): 128 – 135
- Tatar M., Promislow D. E. L. (1997): Fitness costs of female reproduction, *Evolution*, 51: 1323 – 1326

- Timofeyev M. A., Shatilina Z. M., Bedulina D.S., Menzel R., Steinberg C.E. W. (2007): Natural Organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 146: 496 – 503
- Yoshinaga T., Kaneko G., Kinoshita S., Tsukamoto K., Watabe S. (2003): The molecular mechanisms of life history alterations in a rotifer: a novel approach in population dynamics, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 136: 715 – 722
- Yoshinaga T., Kaneko G., Kinoshita S., Furukawa S., Tsukamoto K., Watabe S. (2005): Insulin-like growth factor signaling pathway involved in regulating longevity of rotifers, Hydrobiologia, 546: 347 - 352
- Zadereev E., Lopatina T. (2007): The induction of diapause in *Moina* by species-specific chemical cues, Aquatic Ecology, 41: 255 - 261

Briefe/E-Mails

Santangelo J.
(Doktorand im Laboratório de Limnologia / UFRJ in Rio de Janeiro / Brasilien):
2008-08-04

Suhett A. L.
(Doktorand im Laboratório de Limnologia / UFRJ in Rio de Janeiro / Brasilien):
a) 2008-08-30
b) 2008-10-22

Internet:

¹ <http://www.bwb.de/content/language1/html/941.php>: 12.08.2008

² <http://www.humintech.com/001/animalfeeds/products/huminfed.html>:
05.02.2009

³ http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/C/Cladocera/F/Moinidae/GMoina/Moina_macrocopa/moinamacrocopa.html: 10.09.2008

⁴ <http://bioinf.wehi.edu.au/cgi-bin/russel/logrank/logrank.pl>: 15.11.2008