Steuerung der Energieallokation in Cladoceren durch Futteralgen unterschiedlicher Qualität und unter Stressbedingungen

Von der Fakultät für Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Zoologin
Rihab Bouchnak
Aus Aleppo/ Syrien

Gutachterin: Prof. Dr. Brigitte Nixdorf, BTU Cottbus

Gutachter: Prof. Dr. Christian E.W. Steinberg, HU Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli. 2011

Meinem Großvater Ahmad in liebevoller Erinnerung gewidmet

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Brigitte Nixdorf (BTU Cottbus, Lehrstuhl Gewässerschutz) danke ich für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit. Sie verfolgte die Entwicklung meiner Arbeit und gab mir sowohl zu Beginn als auch im weiteren Verlauf wertvolle Hinweise und Anregungen, die essentiell für die Entwicklung der Dissertation waren.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Christian Steinberg (Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biologie, Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie), der es mir ermöglicht hat, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Für seine Gastfreundschaft und Unterstützung während der letzten Jahre sowie für die Anfertigung des Gutachtens bin ich sehr dankbar. Seine Diskussionsbereitschaft und seine Begeisterung für die Wissenschaft werde ich vermissen.

Mein Dank gilt auch der Aleppo-Universität, die mir das Stipendium gewährt und mir somit die Promotion in Deutschland ermöglicht hat.

Im Sekretariat des Lehrstuhls Gewässerschutz möchte ich mich bei Frau Beate Müller bedanken, die meine wissenschaftlichen Berichte organisiert hat.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gewässer- und Stressökologie (im Allgemeinen) und Dr. Nadine Saul (im Speziellen) danke ich für kleine und große Hilfen.

Auch Frau Dr. Yvonne Pörs danke ich sehr für die guten Gespräche. Ich sehe wieder Land!

Philipp Dachsel danke ich für seine Mithilfe bei den multiplen Korrelationsanalysen und seine freundliche Gesellschaft.

Michal Bagrowski danke ich für die schönen Stunden im Labor und für seine nette Gesellschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Ramona Rauch für ihre ständige Hilfsbereitschaft nicht nur bei der Sprachkorrektur der Arbeit, sondern auch in menschlichen Belangen. Geteiltes Leid ist halbes leid. Herzlichen Dank!!

Im Kindergarten meiner Tochter danke ich ganz herzlich allen Erzieherinnen (im Allgemeinen) und Frau Patricia Richter (im Speziellen). Wir lassen uns „ mit einem lachenden und einem weinenden Auge“ verabschieden!

Meinen Freundinnen (im Allgemeinen) und Awatef (im Speziellen) danke ich. Sie haben mich stets unterstützt und ermutigt.

Allerherzlichst möchte ich mich bei meinen Eltern Aziza und Mohamed und meinen Geschwistern bedanken, die mich jederzeit liebevoll unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Während der Entstehung dieser Arbeit gab es vom Embryonalstadium bis zur Emergenz einige Entwicklungsstadien – inklusive Diapause. In allen Entwicklungsphasen waren unterschiedliche Personen wichtig. Es gab nur eine Person, die in allen Phasen wichtigen positiven Einfluss genommen hat, und das ist mein Mann Hasan, dem ich über alles und zutiefst dankbar bin, dass er mich mit viel Geduld und Verständnis für meine Arbeit bei der Anfertigung der Promotion stets unterstützte und mich in Frust-Phasen wieder aufzubauen wusste.

Zum Schluss danke ich meinen Kindern Abdulrahman und Batoul für ihre Geduld und Ungeduld. Sie mussten ihren Mama besonders in der Schlussphase an vielen Wochenenden entbehren. Das wird jetzt hoffentlich besser!

Und nicht zuletzt danke ich den Wasserflöhen!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen **10**

Zusammenfassung **11**

1 Einleitung **14**

1.1 Ökologische Bedeutung der Cladoceren 14

1.2 Futterqualitätseffekte auf Cladoceren 17

1.3 Ökologische Relevanz von Huminstoffen 20

1.4 Notwendigkeit von Langzeit- und Multigenerationsstudien 21

1.5 Ziele dieser Arbeit 23

2 Material und Methoden **25**

2.1 Übersicht 25

2.2 Futteralgen 27

2.2.1 *Pseudokirchneriella subcapitata* (Koršikov) Hindák 27

2.2.2 *Monoraphidium minutum* (Nägeli) Komárková-Legnerová 1969 29

2.2.3 *Desmodesmus armatus* (R. Chodat) E. Hegewald 2000 30

2.2.4 Algenkultivierung 31

2.2.5 Vorbereitung der Futteralgen für die Analysen 33

2.3 Huminstoff 35

2.4 Daphnienmedium 36

2.5 *Daphnia magna* STRAUS 1820 37

2.5.1 *Daphnia magna* auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 38

2.5.2 *Daphnia magna* auf *Monoraphidium minutum* 38

2.5.3 *Daphnia magna* auf *Desmodesmus armatus* 39

2.6 *Daphnia galeata* SARS 1864 41

2.6.1 *Daphnia galeata* auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 42

2.6.2 *Daphnia galeata* auf *Monoraphidium minutum* 43

2.6.3 *Daphnia galeata* auf *Desmodesmus armatus* 43

2.7 *Moina macrocopa* STRAUS 1820 44

2.7.1 *Moina macrocopa* auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 45
2.7.2 *Moina macrocopa* auf *Monoraphidium minutum* 46
2.7.3 *Moina macrocopa* auf *Desmodesmus armatus* 47

2.8 *Moina micrura* KURZ 1874 48
2.8.1 *Moina micrura* auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 48
2.8.2 *Moina micrura* auf *Monoraphidium minutum* 49
2.8.3 *Moina micrura* auf *Desmodesmus armatus* 50

2.9 Datenerhebung 50
2.10 Statistische Datenauswertung 51

3 Effekte des Huminstoffs HuminFeed® 53

3.1 *Daphnia magna* 53

3.1.1 *Daphnia magna* auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 54

3.1.2 *Daphnia magna* auf *Monoraphidium minutum* 55
3.1.2.1 Ergebnisse 55
3.1.2.1.1 Lebensspanne 55
3.1.2.1.2 Reproduktion 56
3.1.2.2 Diskussion 58

3.1.3 *Daphnia magna* auf *Desmodesmus armatus* 60
3.1.3.1 Ergebnisse 60
3.1.3.1.1 Parentalgeneration 60
3.1.3.1.2 Erste Filialgeneration F1 63
3.1.3.1.3 Zweite Filialgeneration F2 66
3.1.3.1.4 Vergleich der Generationen 70
3.1.3.1.5 Effekte der dauerhaften Exposition gegenüber HuminFeed® 74
3.1.3.2 Diskussion 76

3.2 *Daphnia galeata* 82

3.2.1 *Daphnia galeata* auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 82
3.2.1.1 Ergebnisse 82
3.2.1.1.1 Lebensspanne 82
3.2.1.1.2 Reproduktion 83
3.2.1.2 Diskussion 86

3.2.2 *Daphnia galeata* auf *Monoraphidium minutum* 87
3.2.2.1 Ergebnisse 87
3.2.2.2 Diskussion 88

3.2.3 *Daphnia galeata* auf *Desmodesmus armatus* 88

3.3 *Moina macrocopa* 89

3.3.1 *Moina macrocopa* auf auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 89
3.3.1.1 Ergebnisse 89
3.3.1.1.1 Lebensspanne 89
3.3.1.1.2 Reproduktion 90
3.3.1.1.3 Zusätzlicher Versuch 92
3.3.1.2 Diskussion 94

3.3.2 *Moina macrocopa* auf *Monoraphidium minutum* 97
3.3.2.1 Ergebnisse 97
3.3.2.1.1 Lebensspanne 97
3.3.2.1.2 Reproduktion 98
3.3.2.2 Diskussion 100

3.3.3 *Moina macrocopa* auf *Desmodesmus armatus* 101
3.3.3.1 Ergebnisse 101
3.3.3.1.1 Lebensspanne 101
3.3.3.1.2 Reproduktion 102
3.3.3.2 Diskussion 104

3.4 *Moina micrura* 105

3.4.1 *Moina micrura* auf auf *Pseudokirchneriella subcapitata* 105
3.4.1.1 Ergebnisse 105
3.4.1.1.1 Lebensspanne 105
3.4.1.1.2 Reproduktion 106
3.4.1.2 Diskussion 107

3.4.2 *Moina micrura* auf *Monoraphidium minutum* 108
3.4.2.1 Ergebnisse 108
3.4.2.1.1 Lebensspanne 108
3.4.2.1.2 Reproduktion 110
3.4.2.2 Diskussion 111

3.4.3 *Moina micrura* auf *Desmodesmus armatus* 112

4 Futteralgenqualitäten 114
4.1 Analyse der Futteralgen 114
4.1.1 Fettsäurezusammensetzung 114
4.1.2 Aminosäurezusammensetzung 116
4.1.3 Nährstoffzusammensetzung 118
4.2 Effekte der Futteralgenqualitäten 119

4.2.1 *Daphnia magna* 120
4.2.1.1 Ergebnisse 120
4.2.1.2 Diskussion 125

4.2.2 *Daphnia galeata* 130
4.2.2.1 Ergebnisse 130
4.2.2.2 Diskussion 130

4.2.3 *Moina macrocopa* 133
4.2.3.1 Ergebnisse 133
4.2.3.2 Diskussion 138

4.2.4 *Moina micrura* 144

4.2.4.1 Ergebnisse 144
4.2.4.2 Diskussion 147

5 Schlussfolgerung 151

Literaturverzeichnis 156
Selbständigkeitserklärung 168

Abkürzungen

ADaM	Aachener Daphnien Medium
ANOVA	One Way Analyse of Variance (einfaktoriellen Varianzanalyse)
B	Brut
DAF-16	Transkriptionsfaktor
DOC	dissolved organic carbon (gelöster organischer Kohlenstoff)
F1	Erste Filialgeneration
F2	Zweite Filialgeneration
FW04	Frischwasser Medium (Algenmedium)
HF	HuminFeed®
HSP	heat shock protein
IGF-1	insulin/insulin-like growth factor
K	Kontrollansatz
MW	Mittelwert
NK	Nachkommen
P	Parentalgeneration
PK	Pseudokontrolle
PUFA	polyunsaturated fatty acids (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
SEM	Standard Error of The Mean
W	Weibchen

Zusammenfassung

Viele biotische und abiotische Faktoren bestimmen die Lebensparameter von Cladoceren-Populationen. Einige dieser Faktoren können als Stressoren wirken. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Effekte der unterschiedlichen Futteralgen (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Monoraphidium minutum* und *Desmodesmus armatus*) auf die Lebensparameter (hauptsachlich Lebensspanne und Reproduktion) von vier Cladoceren-Arten (*Daphnia magna*, *D. galeata*, *Moina macrocopa* und *M. micrura*) unter chemischem Stress ausgelöst durch den Huminstoff HuminFeed®.

Um die Effekte vom HuminFeed® auf *D. magna*, einem für ökologische Studien häufig verwendeten Modelorganismus, zu ermitteln, wurden Lebenszyklusexperimente durchgeführt. Dabei wurden Daten der Reproduktion und Lebenspanne erfasst. In umweltrelevanten Konzentrationen wirkte HuminFeed® sich signifikant positiv auf Lebensspanne und signifikant negativ auf die Reproduktion aus. Die Ergebnisse wurden im Licht der Disposable Soma Theorie diskutiert. Es konnte keine Steuerung der Energieallokation unter chemischen Stress ausgelöst durch HuminFeed® und durch die Futteralgenqualität festgestellt werden. Darüber hinaus wurde eine multiple Korrelation zwischen den Lebensspannen von *D. magna* bei verschiedenen Futteralgen und Futterqualitätsfaktoren ermittelt und zwei Formeln entwickelt, um die Qualität anderer Algen und ihre Effekte auf Lebensspanne von *D magna* vorherzsagen zu können. Die Aminosäure Arginin scheint für die Langlebigkeit von *D. magna* verantwortlich zu sein, während die Fettsäure α-Linolensäure für die Fruchtbarkeit von Bedeutung ist.

In einem Multigenerationsexperiment wurde der Einfluss vom HuminFeed® auf *D. magna* über drei Generationen hinweg betrachtet. Dabei wirkte sich HuminFeed® stets negativ auf Reproduktion und positiv auf die Lebensspanne aus. Mütterliche Effekte können in der Lebensgeschichte von *D. magna* eine erhebliche Rolle spielen. Die Ergebnisse des ersten Filialgenerationsversuchs F1 haben gezeigt, dass ein signifikanter Unterschied in der Fruchtbarkeit von Versuchstiere besteht,

die in derselben Umwelt aufgewachsen sind (ohne HF), aber deren Mütter (Parentalgeneration) unterschiedlichen Treatments ausgesetzt waren. Die Ergebnisse des zweiten Filialgenerationsversuchs F2 haben aber aufgezeigt, dass die Umwelt, in der die Parentalgeneration aufgewachsen ist, die Fruchtbarkeit der F2 Generation nicht nachhaltig beeinflusst. Es handelt sich vermutlich um Transgenerationseffekte (epigentische Programmierung).

In einem Langzeitexperiment wurden die Auswirkungen vom HuminFeed® auf die Reproduktion und die Lebensspanne von *D. galeata* untersucht. Es zeigte sich, dass der HuminFeed® signifikant negativ die Reproduktion und signifikant positiv die Lebensspanne der Versuchstiere beeinflusste. Die Ergebnisse wurden im Licht der Disposable Soma Theorie diskutiert

Des Weiteren wurde der Einfluss vom HuminFeed® auf die Lebensparameter von *M. macrocopa* untersucht. Durch die Zugabe von HuminFeed® zum Medium bei Fütterung mit *D. armatus* wurden eine teilweise signifikante Verkürzung der Lebensspanne und eine signifikante Erhöhung der Nachkommenzahl hervorgerufen. Bei Fütterung mit *P. subcapitata* zeigt es sich, dass HuminFeed® eine positive Auswirkung sowohl auf die Reproduktion als auch auf Lebensspanne von *M. macrocopa* hat. Es sind allerdings keine Signifikanzen gefunden worden. Bei Fütterung mit *M. minutum* konnte in exponierten Ansätzen eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne und Erhöhung der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl im Verhältnis zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Hormonähnlichen Effekte der Huminstoffe wurden die in Betracht gezogen. Der unterschiedliche Respons von *M. macrocopa* auf Huminstoffe bei verschiedenen Futteralgen kann darauf hindeuten, dass die Energieallokation in *M. macrocopa* unter dem chemischen Stress ausgelöst durch HuminFeed® durch die Futteralgenqualität gesteuert wurde. Darüber hinaus haben die drei Futteralgen unterschiedliche qualitative Effekte für die Entwicklung der Population von *M. macrocopa* gezeigt, was in den unterschiedlichen biochemischen und mineralischen Zusammensetzung dieser Algen begründet liegt.

Ebenfalls wurde bei *M. micrura* festgestellt, dass die Energieallokation unter dem chemischen Stress ausgelöst durch HuminFeed® und durch die

Futteralgenqualität gesteuert wurde. So wurde gezeigt, dass HuminFeed® einen negativen (teilweise signifikant) Einfluss sowohl auf die Lebensspanne als auch auf die Fruchtbarkeit hat, wenn die Versuchstiere mit *P. subcapitata* gefüttert wurden. Bei den Versuchstieren von *M. micrura* gefüttert mit *M. minutum* wurden teilweise signifikante lebensverkürzende Effekte vom HuminFeed® erzielt. Und ein Trend zur Erhöhung der Nachkommenzahl war sichtbar. Wenn man die Effekte der Futteralgenqualität (unabhängig von HuminFeed®) betrachtet, kann festgestellt werden, dass die Fruchtbarkeit von *M. micrura* mit dem Gehalt an Fettsäuren in der Futteralge positiv korreliert. Im Lebensdauertest zeigten die Futterqualitäten keinen signifikanten unterschiedlichen Effekt.

Aus Laborversuchen dieser Arbeit gibt es Hinweise darauf, dass zwischen Zooplanktonarten Unterschiede hinsichtlich der Response an HuminFeed® und des Bedarfs an einzelnen Futterqualitätsfaktoren bestehen.

1 Einleitung

1.1 Ökologische Bedeutung der Cladoceren

Cladoceren ist eine Organismengruppe, die in limnischen Gewässern weit verbreitet ist und unter anderem deshalb auf großes wissenschaftliches Interesse stößt. In der Nahrungskette eines aquatischen Ökosystems haben Cladoceren, zusammen mit anderen herbivoren Zooplanktonarten, eine große Bedeutung, da sie Phytoplankton (Mikroalgen) konsumieren und selbst wieder eine wichtige Nahrungsquelle für planktivore Fische darstellen. So spielen sie eine wichtige Rolle bei der Energieübertragung von Primärproduzenten zu sekundären und tertiären Konsumern innerhalb des Nahrungsnetzes im aquatischen Ökosystem (Dodson & Frey 2001; Lampert & Sommer 2007).

Arten der Cladoceren pflanzen sich parthenogenetisch fort. Unter optimalen Umgebungsbedingungen sind nur weibliche Individuen in der Population vorhanden. Die weibliche Population produziert weitere genetisch identische weibliche Nachkommen, was seinerseits zur Entstehung einer klonalen Populationsstruktur führt (Hebert et al. 1989). Die asexuelle Fortpflanzung ist eine energetisch optimale Anpassung an stabile, günstige ökologische Bedingungen, unter denen eine schnelle Zunahme der Population stattfindet, da keine Energie für ein zweites Geschlecht zur Verfügung gestellt werden muss.

Wenn sich die Umgebungsbedingungen verschlechtern (z. B. niedrige Temperatur, kurze Photoperiode, Nahrungsknappheit), werden weibliche und männliche Nachkommen produziert, die sich verpaaren. Es kommt zur Befruchtung und danach entsteht über dem Brutraum des Weibchens ein sattelförmiges Gebilde (Ephippium), das zwei Dauereier enthält (Lampert & Sommer 2007). Die Ephippien werden ins Wasser abgegeben. Sie sind äußerst widerstandsfähig und können zum Beispiel Kälte oder Hitze und Trockenheit gut überstehen. Ephippien können ins Sediment absinken, um dort Perioden ungünstiger Lebensbedingungen zu überstehen und viele Jahre (> 50) überleben, um sich bei den günstigeren Bedingungen zu neuen Weibchen zu entwickeln, die sich wieder asexuell fortpflanzen (Lampert & Sommer 2007; siehe Abbildung 1).

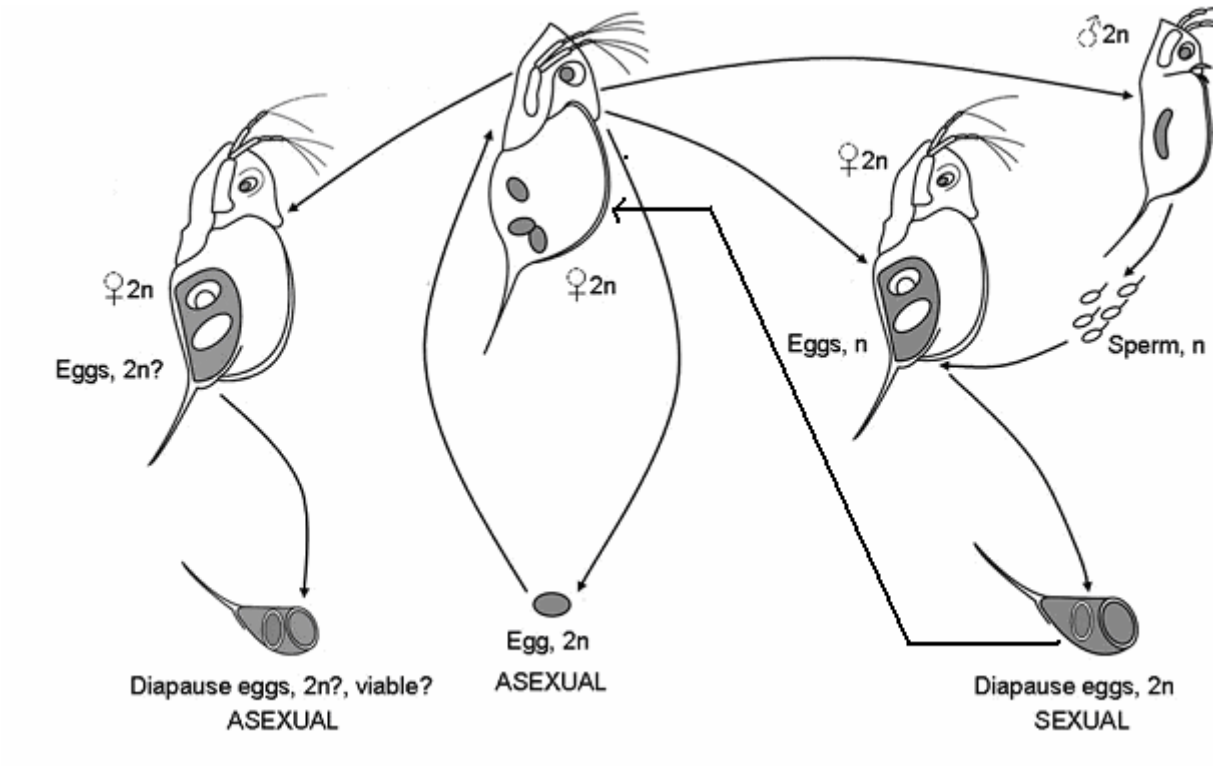

Abbildung 1: Lebenszyklus von Wasserflöhen, hier *Daphnia magna*. Grafik aus Bouchnak & Steinberg (2010), modifiziert.

Ephippien sind daher ein wichtiger Teil der Lebensstrategie, die es der Population ermöglichen, ungünstige Umweltbedingungen zu überstehen. Außerdem sind sie ökologisch wichtig, weil sie neue Habitate besiedeln (z. B. durch den Transport durch Wasservögel) und lokale Populationen nach einer Katastrophe wieder neu etablieren können. Nur wenige Arten der Cladocere *Daphnia* sind in der Lage ohne Männchen Ephippien zu produzieren (Vollmer 1960; Hebert 1981; Bouchnak & Steinberg 2010, siehe Abbildung 2).

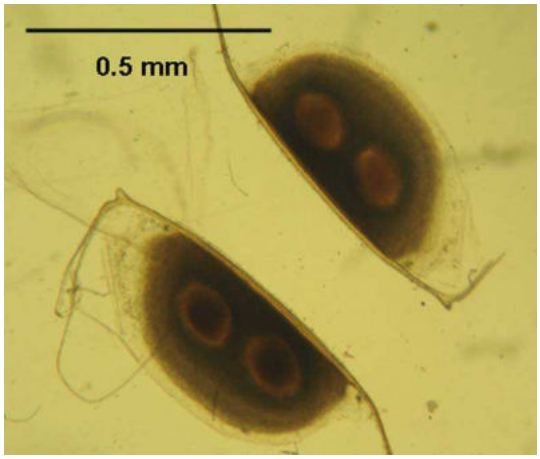

Abbildung 2: Asexuell produzierte Ephippien von *Daphnia magna*. Foto aus (Bouchnak & Steinberg 2010)

Die Verbreitung und das Vorkommen einer Population werden durch verschiedene Faktoren limitiert. Von grundlegender Bedeutung sind dabei die den Organismus bzw. die Population umgebenden abiotischen und biotischen Faktoren. Die Lebensparameter der Zooplankton und damit der Cladoceren werden durch abiotische Faktoren wie zum Bespiel Wassertemperatur und Lichtintensität (Wetzel 2001), Alkalinität und andere Parameter der Wasserqualität (Cowgill & Milazzo 1990) sowie chemische Substanzen wie zum Beispiel Huminstoffe (Steinberg et al. 2010a, 2010b) bestimmt. Biotische Faktoren wie zum Beispiel die Quantität und die Qualität der Nahrung (Geller & Müller 1981; Wetzel 2001) sowie Konkurrenz um die Nahrungsquellen (Gyllström & Hansson 2004) und Prädation von planktivoren Fischen, Insekten und Insektenlarven (Lampert 1993) beeinflussen ebenfalls die Lebensparameter der Cladoceren. Abbildung 3 soll diese Faktoren verdeutlichen.

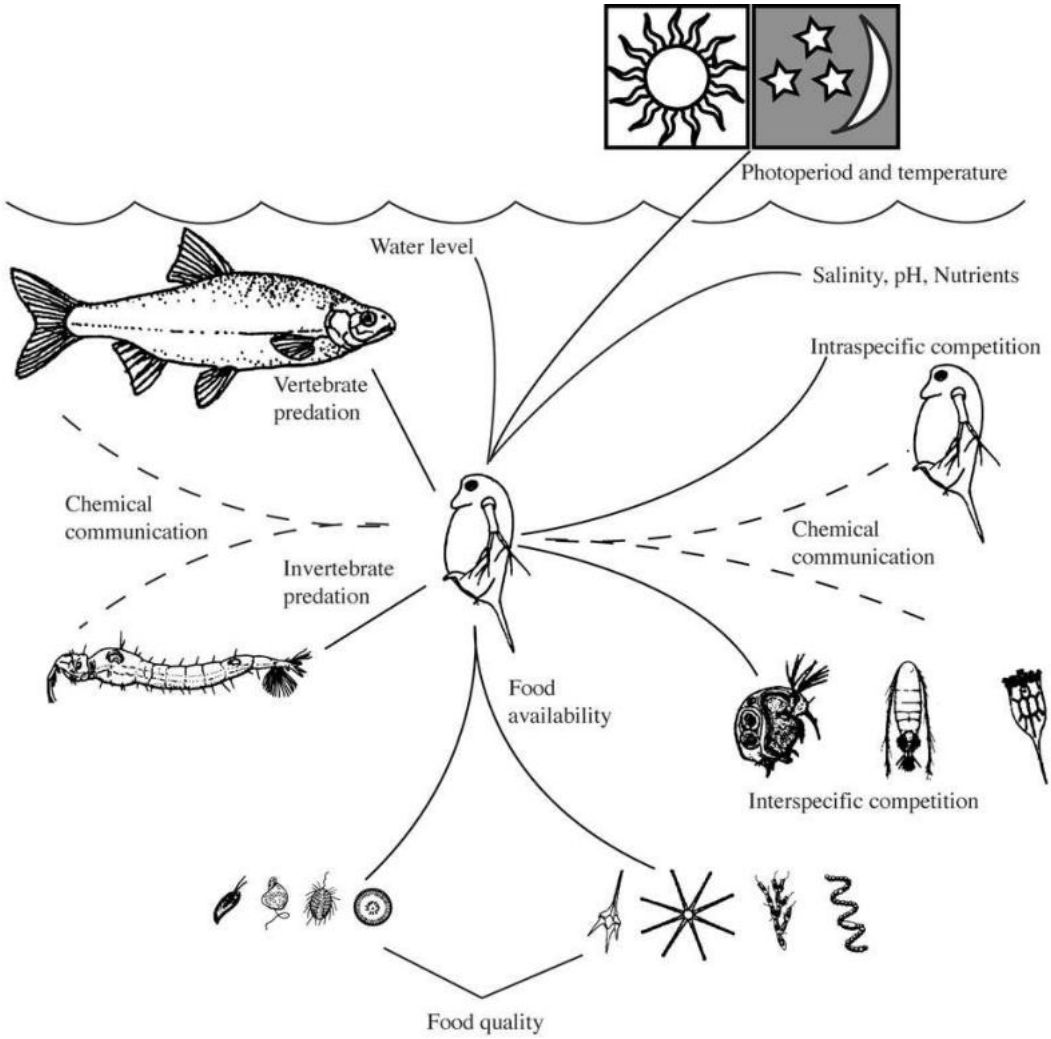

Abbildung 3: Abiotische und biotische Einflussfaktoren auf Wachstum, Reproduktion und Mortalität von Zooplankton. (aus Gyllström & Hansson 2004).

1.2 Futterqualitätseffekte auf Cladoceren

Es gibt zahlreiche Untersuchungen darüber, welche qualitative (z. B. Ahlgren et al. 1990; Koch et al. 2009; Martin-Creuzburg et al. 2005; Sterner 1993) und/oder quantitative (z. B. Lampert 1978; Pietrzak et al. 2010) Bedeutung verschiedener Algenspezies für die Lebensparameter von Cladoceren haben.

Cladoceren sind nicht in der Lage, Futterpartikel aufgrund der Futterqualität zu diskriminieren (DeMott 1986). Sie filtrieren innerhalb einer bestimmten Größenfraktion, deren Minimum durch den Abstand der Setulae und deren Maximum durch die Größe der Carapaxspalte festgelegt sind (Geller & Müller 1981). Aus diesem Grund sind sperrige, fädige, kolonienbildende Algen, sowie Algen mit Schalen weniger geeignet als rundliche und einzellige Algen (z. B. Vanni und Lampert 1992). Sind die Algen fressbarer Größe weder toxisch noch besitzen sie morphologische Verteidigungsstrukturen wie Stacheln oder gelatinöse Hüllen, so gelten sie für Cladoceren als gut verdaubar. Dies vernachlässigt jedoch jegliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Futteralge. Für Cladoceren als unselektive Filtrierer ist deshalb die Qualität des verfügbaren bzw. aufgenommenen Futters identisch. Die Futterqualität hängt außer von der Partikelform und -größe auch von der mineralischen (z. B. Sterner 1993; Sterner et al. 1993) und der biochemischen Zusammensetzung (z. B. Ahlgren et al. 1990; Müller-Navarra 1995a, b; Martin-Creuzburg & von Elert 2009) der filtrierten Partikel ab. Sind einzelne mineralische bzw. biochemische Substanzen für eine limitierende Wirkung verantwortlich, handelt es sich um essenzielle Substanzen. Solche Limitationen des Wachstums der Cladoceren sind für mineralische Nahrungsinhaltsstoffe gut dokumentiert. Zum Bespiel nahm die Futteralgenqualität für Cladocere *Daphnia obtusa* bei zunehmender Nährstofflimitierung der Alge *Scendedesmus acutus* (Stickstoff- und Phosphorlimitierung) ab (Sterner 1993). Darauf aufbauend wurde ein Konzept der Limitierung des Zooplanktons durch mineralische Inhaltsstoffe entwickelt (Sterner et al. 1993). Phosphor ist ein wichtiger Bestandteil der Phospholipide, des Stoffwechselenergiespeichers Adenosintriphosphat (ATP) und der Nukleinsäure, deshalb beteiligt der Phosphor im Wachstum und in der Reproduktion der Zooplankter (Ferrão-Filho et al. 2003; Vrede et al. 2002, 2004). Potentielle Limitation des Zooplanktons durch Phosphor

ist nicht durch die absolute Konzentration vom Phosphor in der Nahrung, sondern durch das atomare Verhältnis von Kohlenstoff und Phosphor bestimmt. So wirkt die Nahrung der Daphnien limitierend, wenn das Verhältnis (C:P) einen bestimmten Schwellenwert überschreitet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Schwellenwert von C:P-Verhältnis in der Nahrung für die Wachstumslimitation von Daphnien anhand verschiedener Literatur.

Schellenwert vom C:P	Literatur
300	Boersma 2000
	DeMott et al. 1998
	Hessen 1992
	Sterner 1993
	Sterner et a. 1993
	Sterner & Hessen 1994
	Sterner & Elser 2002
	Urabe & Sterner 1996
	Urabe et al. 1997
60 – 250	Müller-Navarra 1995b
160 - 570	Hessen 1989
210 - 390	Urabe & Watanabe 1992
320 - 650	Olsen et al. 1986
2266	Sterner et. al. 1993

Dafür, dass bei Unterschreitung des Schwellenwerts vom C:P-Verhältnis andere Substanzen als der Phosphor für die Futterqualität bestimmend sein können, gibt es mehrere Hinweise. Dabei kommen als limitierende Nahrungsbestandteile die biochemischen Komponenten, hauptsachlich Fettsäuren, in Frage. Das Konzept der mineralischen Phosphorlimitation wurde kritisch diskutiert, wobei argumentiert wird, dass bei unterschiedlicher Nährstofflimitation der Algen auch biochemische Inhaltsstoffe verändert werden (Müller-Navarra 1995b; Sundbom & Vrede 1997). Zum Beispiel fand Müller-Navarra (1995b), dass das Wachstum von *Daphnia galeata* bei der Verfütterung der phosphorlimitierten Alge *Cyclotella meneghiniana*, die aber viele hoch ungesättigte Fettsäuren enthielt, besser war als bei der Verfütterung der phosphorgesättigten Alge *Scenedesmus acutus*, die kaum hoch ungesättigte Fettsäuren enthielt. Somit scheinen mehrfach ungesättigte

Fettsäuren für die Futterqualität der Algen von Bedeutung zu sein. Da Pflanzen im Allgemeinen die für Tiere essentiellen Fettsäuren bilden können, stellen sie die Hauptquelle dieser Fettsäuren dar. Die Algenarten weisen große stöchiometrische Variabilität auf. Sie unterscheiden sich in ihrer Fettsäurezusammensetzung, sowohl in der Quantität als auch in der Qualität. Aus den großen Unterschieden der Fettsäuremuster von Algenarten ergibt sich, dass bestimmte Fettsäuren als charakteristisch für die verschiedenen Algengruppen angesehen werden. So zeichnen sich die Mikrogrünalgen durch relativ hohe Anteile an ungesättigten Fettsäuren: einfach ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (18:1), mehrfach Linolsäure (18:2n-6) und α-Linolensäure (18:3n-3) aus und auch innerhalb der Mikrogrünalgen können taxonomisch relevante Unterschiede im Fettsäuremuster der einzelnen Vertreter festgestellt werden (Ahlgren et al. 1990; Patil et al. 2007). Im Gegensatz zum Unterschied in der Fettsäurezusammensetzung sind die Unterschiede anderer essenzieller, biochemischer Grundbausteine, wie z. B. der Aminosäuren, zwischen den Phytoplanktongruppen weit geringer (Ahlgren et al. 1992; Brown 1991).

Obwohl die Rolle der Futterqualität in aquatischen Nahrungsnetzen, insbesondere zwischen Daphnien und ihrem Futteralgen, in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht wurde, wurden nur wenige Arbeiten über die Abhängigkeit der Lebensspannen von der Futterqualität publiziert: So untersuchten Sundbom & Vrede (1997) den Einfluss des Futteralgengehalt an Fettsäuren bzw. am Phosphor auf das Wachstum, die Lebensspanne und die Reproduktion von *Daphnia galeata* und zeigten, dass besonders der Phosphor Einfluss auf alle Lebensparameter nahm, und betrachten die Wachstumslimitation von *D. galeata* aufgrund von Fettsäuren als sekundären Effekt der Phosphorlimitation.

So dass die Auswirkung der Futterqualität auf Lebensparameter der Cladoceren ein sehr interessanter Aspekt ist, dem viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde bzw. wird.

1.3 Ökologische Relevanz von Huminstoffen

Ein anderer interessanter bzw. wichtiger Aspekt, in dem Cladoceren-Arten als Testorganismen genutzt wurden, ist der Einfluss von unterschiedlichen chemischen Substanzen (Teststoffen) auf Lebensparameter von Cladoceren-Arten. Dazu gibt es unzählige Versuche und Ansätze von unterschiedlichen Arbeitgruppen (z. B. Mano et al. 2010; Sarma & Nandini 2006).

Obwohl es kein Oberflächengewässer (Süßwasser, die Habitat von Cladoceren) ohne Huminstoffe gibt (Steinberg 2003), existieren bislang nur wenige Arbeiten, die sich auf die direkte und undirekte Effekte von Huminstoffe auf Lebensparameter von Cladoceren-Arten konzentrieren (Bouchnak & Steinberg 2010; Euent et al. 2008; Looser et al. 1898; Meems et al. 2004; Petersen & Persson 1987; Steinberg et al. 2010a, 2010b; Suhett et al. 2011).

Huminstoffe sind in aquatischen Lebensräumen weit verbreitet und machen mit 50-80% den größten Teil des gelösten organischen Kohlenstoffs DOC in allen Frischwassersystemen aus (Thurman 1985; Wetzel 2001). Gelöster organischer Kohlenstoff liegt in Gewässern in Konzentrationen zwischen 1 und 100 mg/l vor (Steinberg 2003), in extrem huminstoffreichen Gebieten, wie brasilianische Lagunen, sogar bis zu ca. 160 mg/l DOC (Suhett et al. 2004). Auch gibt es huminstoffarme Gewässer, wie zum Beispiel den Baikalsee, die Huminstoffe in Konzentrationen von < 1 mg/l DOC haben (mündliche Mitteilung Prof. Steinberg).

Bei den Huminstoffe handelt es sich um komplexe organische Moleküle. Sie sind wasserlöslich (Meinelt et al. 2007), besitzen zahlreiche funktionelle Gruppen (z. B. Carbonyl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Phenyl-, Chinon-, Keto-, Aldhyd- und Aminogruppen) und damit hydrophobe sowie hydrophile Anteile und weisen sowohl aliphatische als auch aromatische Strukturen auf. Diese Eigenschaften ermöglichen direkte Wechselwirkungen mit der Umwelt, die eine Vielzahl von Organismen betreffen (Steinberg et al. 2003, 2006). Es ist also anzunehmen, dass Huminstoffe eine wichtige Rolle im Süßwasser spielen und neben Licht, Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffvorkommen stellen sie einen weiteren abiotischen Umweltfaktor dar (Steinberg et al. 2008). Huminstoffe können in

direkter und indirekter Weise auf Organismen wirken. Sie können sich aufgrund ihres Kohlenstoff- und Stickstoffanteils als externe Energie- und Nährstoffquelle auswirken (Jones 1992). Zu den spezifischen Effekten zählt die Wirkung der Huminstoffe als hormonähnliche Substanz (z.B. Förderung der Reproduktion) zu (Steinberg et al. 2004). Außerdem können sich Huminstoffe auf phänotypischer Ebene des Lebens von verschiedenen Organismen auswirken. Sie erzielten zum Beispiel Lebensverlängerungseffekte bei männlichen Wasserflöhen der Art *D. magna* (Euent et al. 2008) und auch bei weiblichen Wasserflöhen derselben Art (Bouchnak & Steinberg 2010).

Huminstoffe sind als Stressoren bekannt (z. B. Steinberg et al. 2008). Nach bisherigen Erkenntnissen können die direkten Wirkungen der Huminstoffe bei Organismen oxidative Stress auslösen. Sie führen zur Aktivierung von Sauerstoff (Timofeyev et al. 2006) und induzieren Antistressantworten (Steinberg et al. 2010a).

1.4 Notwendigkeit von Langzeit- und Multigenerationsstudien

Da bei Standardverfahren (wie z. B. OECD 1998) nicht der gesamte Lebenszyklus der Daphnien, sondern nur ein Ausschnitt davon beobachtet wird, können Effekte, die erst in späteren Lebensstadien auftreten, aufgrund der kurzen Expositionsdauer übersehen werden. Bei einer lebenslangen Exposition können hingegen auch mögliche Langzeiteffekte eines Wirkstoffes bzw. eines Stressors auf die Organismen berücksichtigt werden. Bedingt durch die kontinuierliche Exposition gegenüber einem Stressor bzw. einem Stoff in die aquatische Umwelt sind die darin lebenden Organismen permanent über mehrere Generationen diesem Stoff bzw. diesem Stressor ausgesetzt. Um potentielle multigenerationale Auswirkungen detektieren zu können, müssten die Organismen sogar über mehrere Generationen hinweg dem Stressor ausgesetzt werden. Eine Ausweitung der Expositionsdauer über mehrere Filialgenerationen könnte dabei noch detailliertere Informationen über die Langzeitwirkung des untersuchten Stressors auf die betreffenden Organismen liefern. Einige wenige Studien konnten bereits darlegen, dass die Organismen der Filialgenerationen unterschiedlicher Weise von

Teststoffen beeinflusst werden können. So beobachteten Brennan et al. (2006), dass das Östrogen Diethylstilbestrol keinen signifikanten Einfluss auf die Parentalgeneration von *Daphnia magna* hatte, während es sich signifikant negativ auf die Fruchtbarkeit der ersten Filialgeneration auswirkte. Im Gegensatz dazu konnten Clubbs und Brooks (2007) zeigen, dass die erste Filialgeneration von *D. magna* eine Resistenz gegenüber endokrin wirksamen Stoffen entwickelte und somit hinsichtlich der Fruchtbarkeit, dem Geschlechterverhältnis sowie dem Trockengewicht der Nachkommen weniger beeinflusst als die Daphnien der Parentalgeneration. Man kann hier von einer Akklimatisierung an die Wirkstoffe ausgehen.

Darüber hinaus wurden die Transgenerationseffekte (weitergabe erworbener Eigenschaften der Parentalgeneration an Filialgenerationen) durch epigenetische Programmierung diskutiert. Das Gebiet der Epigenetik umfasst sämtliche vererbbare Veränderungen der Genexpression, bei denen keine Änderungen der DNA-Sequenz vorliegen. Die epigenetische Programmierung liefert einen wichtigen Beitrag zur interindividuellen phänotypischen Diversität und vermittelt die Interaktion zwischen Umweltfaktoren und Genomen (Szyf 2009) und kann sowohl persistieren als auch über mehrere Generationen weitergegeben werden (Anway et al. 2005). Die epigenetische Genregulation wird über verschiedene Mechanismen gesteuert. Die beiden am besten untersuchten Mechanismen sind dabei die DNA-Methylierung und die Histon-Modifizierung. Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine chemische Änderung der Erbsubstanz durch die Übertragung von Methylgruppen auf Cytosine innerhalb von CpG-Dinukleotiden. Diese DNA-Modifizierung kann zur Inaktivierung der Genexpression führen (Szyf 2009). Allerdings gibt es bisher nur wenige Veröffentlichungen, die über mögliche epigenetische Regulation der Genexpression in *D. magna* berichten. So wurde dieser Aspekt bei *D. magna* von Vandegehuchte et al. (2009) bearbeitet. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass DNA-Methylierung auch in *D. magna* auftritt.

Huminstoffe-Exposition bewirkt auch einen Transgenerationseffekt, wie kürzlich von Suhett et al. (2011) in Cladocere *Moina macrocopa* Straus auf der phänotypischen Ebene gezeigt wurde: Vorexposition der Elterngenerationen

gegen indigene Huminstoffe einer atlantischen Küstenlagune Brasiliens, in die gelegentlich Salzwasser einbricht (wodurch ein osmotischer Stress hervorgerufen wird) versetzt die Filialgeneration in die Lage, den Salzstress besser zu verkraften. Suhett et al. wiesen dies an den signifikant größeren Körpern der Filialgeneration beim ersten Gelege nach; die Filialgeneration wurde selbst nicht mehr gegen Huminstoffe exponiert.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Effekte von drei ausgesuchten Futteralgen unterschiedlicher Qualitäten (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Koršikov) Hindák*, Monoraphidium minutum* (Nägeli) Komárková-Legnerová und *Desmodesmus armatus* (R. Chodat) E. Hegewald) auf Lebensparameter von vier Cladoceren-Arten (*Daphnia magna* Straus, *Daphnia galeata* Sars, *Moina macrocopa* Straus und *Moina micrura* Kurz) unter chemischem Stress ausgelöst durch das Huminstoffpräparat HuminFeed® untersucht. Dabei wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Kann die kolonienbildende Alge *D. armatus* von Cladoceren ingestiert werden oder ist sie als Futter wenig geeignet?
2. Wirken sich unterschiedliche Grünalgen unterschiedlich auf Lebensparameter von cladoceren aus? Und von welchem Futterqualitätsfaktor ist die Wirkungsweise der Futteralge abhängig?
3. Wird die Energieallokation in Cladoceren unter chemischen Stress ausgelöst durch HuminFeed® durch Futteralgenqualität gesteuert?
4. Wirkt sich der HuminFeed® bereits in umweltrelevanten Konzentrationen auf Lebensparameter der Cladoceren aus? Und können dabei Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen festgestellt werden?
5. Welchen Einfluss hat HuminFeed® auf Lebensspanne und Reproduktion von *D. magna* im Multigenerationsansatz? Und ist dieser Einfluss dauerhaft?
6. Gibt es Hinweise für Transgenerationseffekte?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden Langzeitversuche durchgeführt. In einem Lebenszyklusexperiment wurden die Effekte des Huminstoffpräparates HuminFeed® auf *Daphnia magna* bei Fütterung mit der Futteralge *M. minutum* untersucht. Darüber hinaus wurden in einem Multigenerationsversuch bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* die Effekte vom HuminFeed® auf die Lebensparameter von *D. magna* in Parentalgeneration und zwei Filialgenerationen ermittelt.

Außerdem wurden in dieser Arbeit Langzeitexperimente durchgeführt, bei denen die Auswirkungen des Huminstoffpräparates HuminFeed® auf die Reproduktion und auf die Lebensspanne von *D. galeata* getestet wurden.

Des Weiteren wurden die Effekte des Huminstoffpräparates HuminFeed® auf Lebensparameter (hauptsachlich Reproduktion und Lebensspanne der Versuchstiere) von zwei kurzlebigen Cladoceren-Arten (*Moina macrocopa* und *M. micrura*) untersucht. Dabei stand die Qualität der Futteralgen im Mittelpunkt des Interesses.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht

Cladoceren ist eine Unterordnung der Klasse Branchipoda (Blattfußkrebse) und gehört damit zu den Krebstieren Crustacea (zur Taxonomie siehe Tabelle 2). Der deutsche Name „Wasserflöhe“ ist wohl auf die Größe und die Fortbewegung der Cladoceren zurückzuführen.

Tabelle 2: Taxonomie der Cladoceren[1]

Biota
- Domain Eukaryota - Eukaryotes
  - Kingdom Animalia Linnaeus, 1758 - Animals
    - Subkingdom Bilateria (Hatschek, 1888) Cavalier-Smith, 1983 - Bilaterians
      - Branch Protostomia Grobben, 1908 - Protostomes
        - Infrakingdom Ecdysozoa Aguinaldo et al., 1997 ex Cavalier-Smith, 1998 - Ecdysozoans
          - Superphylum Panarthropoda
            - Phylum Arthropoda Latreille, 1829 - Arthropods
              - Subphylum Mandibulata Snodgrass, 1938
                - Infraphylum Crustaceomorpha (Chernyshev, 1960)
                - Superclass Crustacea Pennant, 1777 - Crustaceans
                - Epiclass Eucrustacea
                - Class Branchiopoda Latreille, 1817 - Branchiopods
                - Subclass Phyllopoda Preuss, 1951
                - Order Diplostraca Gerstaecker, 1866
                - Suborder Cladoceren Latreille, 1829 – Cladocerenns

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von drei ausgesuchten Futteralgenqualitäten (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Monoraphidium minutum* und *Desmodesmus armatus*) auf die Lebensparameter von vier Wasserfloh-Arten (*Daphnia magna*, *Daphnia galeata*, *Moina macrocopa* und *Moina micrura*) unter chemischem Stress ausgelöst durch das Huminstoffpräparat HuminFeed® geprüft. Die durchgeführten Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In Rahmen dieser Arbeit wurden stets neugeborene (≤ 24 h alt) weibliche Wasserflöhe als Versuchstiere verwendet. Anhand der ersten Antenne eines Wasserflohs wurde

[1] http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=94026 stand am 2.3.11

unter dem Mikroskop (Olympus CH-2, Japan, 4-facher Vergrößerung) das weibliche Geschlecht der Versuchstiere bestimmt. Bei den männlichen Wasserflöhen ist die erste Antenne im Gegensatz zu den Weibchen stark verlängert (Vollmer 1960). Eine weitere Besonderheit ist die Transparenz von Wasserflöhen, die eine direkte Beobachtung der Eier oder Embryonenentwicklung in der Brutkammer eines Weibchens (ab der Primipara) ermöglicht und damit einen Beweis für das weibliche Geschlecht eines Versuchstieres darstellt. Die Untersuchungen hierzu wurden unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt. Untersucht wurden die Lebensspanne, die Reproduktion und die Beobachtungen während des gesamten Lebenszyklus z. B. das Alter bei der ersten Brut und die Zeit zwischen zwei Bruten. Der Endpunkt eines Versuchs ist der Tod aller Versuchstiere. Die Aufzucht der Wasserflöhe, sowohl in den Stammkulturen und Vorkulturen als auch in den eigentlichen Versuchen dieser Arbeit, wurde im Daphnienzuchtraum unter kontrollierten Laborbedingungen bei Dauerlicht und einer Temperatur von 22±1 °C durchgeführt. Die Temperatur im Daphnienzuchtraum wurde mit Hilfe eines Thermostates (Heller Thermostat) im Winter und einer Klimaanlage (Delonghi Pinguino 92) im Sommer stabilisiert. Die Futterqualität und –quantität und Populationsdichte der Wasserflöhe (50 Wasserflöhe pro Liter) in der Vorkultur waren mit jenen im nachfolgenden eigentlichen Versuch identisch. Es wurde meistens versucht, die Vorkultur mit einem Weibchen zu starten, um eine reine Population zu produzieren. Bei jedem Versuch wurden immer alle Ansätze gleichzeitig aus dem Zuchtraum genommen und wieder zurückgestellt, damit der Kontrollansatz und die exponierten Ansätze stets die gleiche Behandlung erfuhren. Beim Zurückstellen wurde jeweils die Lage (hinsichtlich des Lichtes) der einzelnen Gläschen verändert, um nicht standortbedingte Unterschiede zu haben.

Tabelle 3: Kombination der Versuche und Versuchswiederholungszahl

Cladoceren	Futteralgen		
	P. subcapitata	*M. minutum*	*D. armatus*
D. magna	1x (in Masterarbeit)	1x	1x
D. galeata	2x	2x (Parasitenbefall)	Nur Vorversuch
M. macrocopa	2x	2x	1x
M. micrura	2x	2x	Nur Vorversuch

2.2 Futteralgen

Für Wasserflöhe als unselektive Filtrierer ist die Qualität des verfügbaren und aufgenommenen Sestons identisch. Sie filtrieren innerhalb einer bestimmten Größenfraktion, deren Minimum durch den Abstand der Setulae und deren Maximum durch die Größe der Carapaxspalte festgelegt sind (Geller & Müller 1981). Aus diesem Grund sind sperrige, fädige, kolonienbildende Algen, sowie Algen mit Schalen weniger geeignet als rundliche und einzellige Algen (z. B. Vanni und Lampert 1992). Cyanobakterien sind wegen ihrer Toxine und auch ihrer Form bzw. ihres Volumens ein wenig geeignetes Futter für Zooplankter (Lampert 1987, Gulati und DeMott 1997). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und dem Test der Arbeitshypothese, dass

- kolonienbildende Algen als Futter für ausgesuchte Wasserflöhe wenig geeignet sind und dass
- die Zusammensetzung der Fettsäure und Nährstoffe der Algen und damit die Qualität dieser Algen nicht identisch sein sollten,

wurden drei Futtergrünalgen ausgesucht: die kolonienbildende Alge *Desmodesmus armatus* (mit einem mittleren Zelldurchmesser von 5,27 µm (Mittelwert von 10 Messproben), gemessen mit dem Zellanalysesystem CASY1, Schärfe, Reutlingen, Deutschland) und zwei ähnliche Algen (in der Zellform und im Zellvolumen) *Pseudokirchneriella subcapitata* (mit einem mittleren Zelldurchmesser von 3,85 µm, Bouchnak und Steinberg 2010) und *Monoraphidium minutum* (mit einem Durchmesser von 3,5 µm, Rothhaupt 1988).

2.2.1 *Pseudokirchneriella subcapitata* (Koršikov) Hindák

Pseudokirchneriella subcapitata (Koršikov) Hindák (syn. *Selenastrum capricornutum, Ankistrodesmus subcapitata, Raphidocelis subcapitata*) ist eine kokkale Mikrogrünalge (zur Taxonomie siehe Tabelle 4), die als Einzelzelle vorkommt. Sie hat eine mondsichelförmige Gestalt (Abbildung 4), vermehrt sich vegetativ über Zellteilung mit 2, 4 oder 8 Autosporen und ist obligatorisch autotroph (Nygaard et al. 1986).

Tabelle 4: Taxonomie der Alge *P. subcapitata* (Koršikov) Hindák (vorher als *Raphidocelis subcapitata* genannt)[2].

Biota

Domain Eukaryota Eukaryotes

Kingdom Plantae Haeckel, 1866 - Plants

Subkingdom Viridaeplantae Cavalier-Smith, 1981 - green Plants

Phylum Chlorophyta A. Pascher, 1914 - green Algae

Class Chlorophyceae™ Wille

Order Chlorococcales Pascher

Family Oocystaceae Bohlin

Genus *Raphidocelis* F. Hindák, 1977

Raphidocelis subcapitata (Korshikov) Nygaard et al.

Die in dieser Arbeit verwendete Stammkultur der Alge *P. subcapitata* gehört zu der Algenstammsammlung der Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie des Instituts für Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin. Ursprünglich wurde die kokkale Mikrogrünalge *P. subcapitata* 1959 von O. Skulberg in Norwegen aus dem Fluss Nitelva bei Akershus isoliert (Sammlung von Algenkultur Göttingen Deutschland, Stamm-Nr. SAG 61.81).

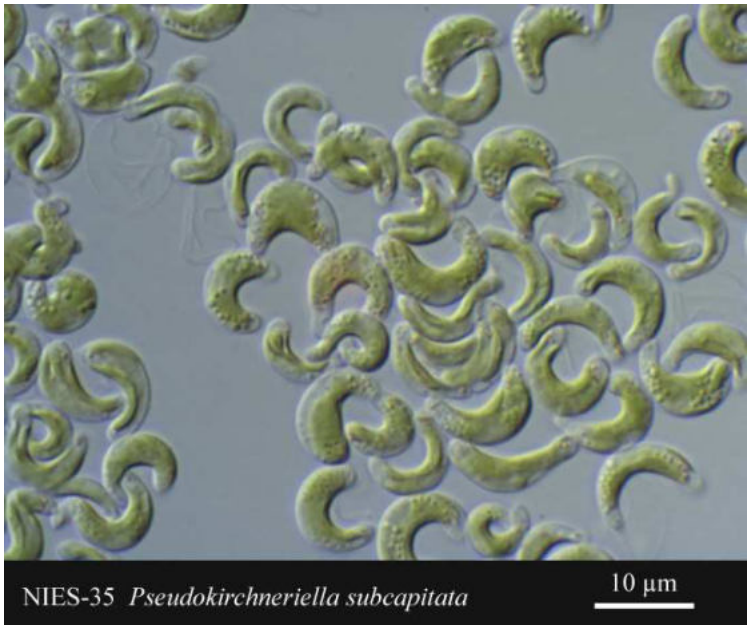

Abbildung 4: Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata*[3]

[2]Taxonomie der Alge *Pseudokirchneriella subcapitata* bei: Systema Naturae 2000 unter: http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=559931&tree=0.1 stand am 12.6.11

[3] Bild-Quelle: http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetail.jsp stand am 16.10.09

2.2.2 *Monoraphidium minutum* (Nägeli) Komárková-Legnerová 1969

Monoraphidium minutum (Nägeli) Komárková-legnerová 1969[4] ist eine sichelförmige Mikrogrünalge (zur Taxonomie siehe Tabelle 5). Die in dieser Arbeit verwendete Stammkultur der Alge *M. minutum* ist ursprünglich von der Sammlung der Algenkultur Göttingen SAG, Deutschland (SAG 243-1). Sie hat eine mondsichelförmige Gestalt (Abbildung 5).

Tabelle 5: Taxonomie der Alge *Monoraphidium minutum*[5]

Biota
Domain Eukaryota - Eukaryotes
Kingdom Plantae Haeckel, 1866 - Plants
Subkingdom Viridaeplantae Cavalier-Smith, 1981 - green Plants
Phylum Chlorophyta A. Pascher, 1914 - green Algae
Class Chlorophyceae™ Wille
Order Sphaeropleales Luerssen
Family Ankistrodesmaceae Korshikov
Genus *Monoraphidium* Komárková-Legnerová, in Fott, 1969
Monoraphidium minutum (Nägeli) Komárková-Legnerová.

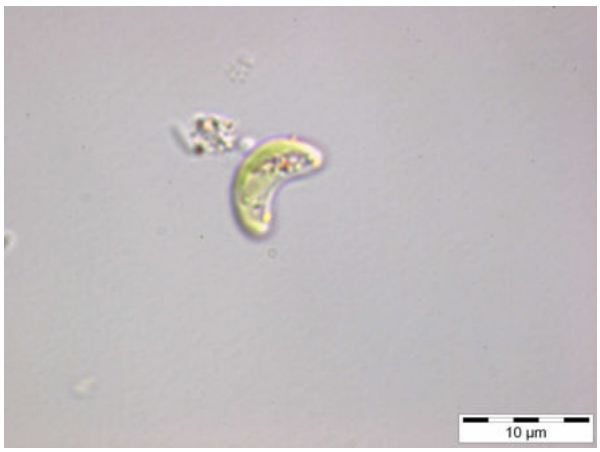

Abbildung 5: Grünalge *Monoraphidium minutum*[6]

[4] http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=58561 stand am 1.12.10
[5] Taxonomie der Alge *Mmonoraphidium minutum* bei: Systema Naturae 2000 unter: http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=165763&tree=0.1 stand am 11.2.11
[6] Bild-Quelle: http://www.planktonforum.eu/index.php?id=33&no_cache=1&L=&tx_pydb_pi1[details]=3762

2.2.3 *Desmodesmus armatus* (R. Chodat) E. Hegewald 2000

Diese Alge ist der Stamm 041, der zu der Algenstammsammlung der Arbeitgruppe Stress- und Gewässerökologie des Instituts für Biologie an der Humboldt Universität zu Berlin gehört. Sie wurde am 09.06.1980 aus dem Müggelsee entnommen, isoliert und weiterkultiviert. Von Krienitz wurde sie als *Scenedesmus armatus* am 26.05.1995 bestimmt (mündliche Mitteilung von Dr. Henning, ehemaliger Mitarbeiter des Instituts für Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin). Diese Alge ist von Hegewald (2000) als *Desmodesmus armatus* umbenannt (zur Taxonomie siehe Tabelle 6). Die Zellen der Alge *D. armatus* sind oval (eiförmig) oder länglich elliptisch und beide Enden einer Zelle sind abgerundet. Meistens sind 2, 4, 8 oder 16 Zellen in einer Reihe aneinander befestigt (van den Hoek 1978). und so zu einer spezifischen Kolonie (Coenobium)[7] vereinigt. Die äußeren Zellen besitzen Fortsätze an beiden Enden (Abbildung 6).

Tabelle 6: Taxonomie der Alge *Desmodesmus armatus* (vorher *Scenedesmus armatus*)[8].

Biota
- Domain Eukaryota - Eukaryotes
  - Kingdom Plantae Haeckel, 1866 - Plants
    - Subkingdom Viridaeplantae Cavalier-Smith, 1981 - green Plants
      - Phylum Chlorophyta A. Pascher, 1914 - green Algae
        - Class Chlorophyceae™ Wille
          - Order Chlorococcales Pascher
            - <u>Family Scenedesmaceae Oltmanns</u>
              - Genus *Scenedesmus*™ F.J.F. Meyen, 1829
                - *Scenedesmus armatus* (Chodat) Smith

[7] Ein Coenobium (Plural: Coenobien) ist eine Kolonie, die eine bestimmte feste Zellanzahl mit wenig oder ohne Spezialisierung (Arbeitsteilung) enthält (http://de.wikipedia.org/wiki/Coenobium)

[8] Taxonomie der Alge *Desmodesmus armatus* bei: Systema Naturae 2000 unter: http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=165859&tree=0.1 stand am 11.2.11

Abbildung 6: *Desmodesmus armatus*[9]

2.2.4 Algenkultivierung

Als Nährmedium zur Algenkultivierung wurde das Frischwasser Medium FW04 (Nicklisch et al. 2008) verwendet (Tabelle 7). Zur Herstellung von 5 L des Algenmediums wurden die Makroelemente (außer Calciumcarbonat $CaCO_3$) in zwei Liter destilliertes Wasser aufgelöst. Dazu kamen die Spurenelemente, die für eine konzentrierte Stammlösung in Salzsäure (0.1 N) gelöst wurden. Zudem wurde Eisen- und Natrium-EDTA zugefügt, das in destilliertem Wasser gelöst und dann nach kurzem Aufkochen (Mikrowelle) ebenfalls als Stammlösung aufbewahrt wurde. Anschließend wurde 0.5 ml SeO_2 (in Konzentration von 0.007 g/100ml) zugefügt, dann mit destilliertem Wasser auf 4 l aufgefüllt und autoklaviert (Sysrec 5050ELV, Tuttnauer, Wettenberg), um das Bakterienwachstum in Algenkulturen zu minimieren. Nach dem Autoklavieren wurde Calciumcarbonat hinzugefügt, das in 1 Liter Reinstwasser (Reinstwasseranlage PRO 90 CN, Seralpur, Burladingen) unter CO_2-Zusatz und Rühren gelöst wurde.

Im Kühlschrank Privileg de luxe (dunkel, 6 °C) bzw. in einer Kühlzelle (dunkel, 6-7 °C, VEB Kühlanlagebau, Dresden) wurde dann das Algenmedium FW04 bis zur weiteren Verwendung gelagert. Im Gleichgewicht mit der Luft bei 20 °C sollte der pH-Wert ca. 8.3 betragen

[9] Bild-Quelle: http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/scenedesmus/armatus/sp_8.html stand am 11.6.11

Tabelle 7: Zusammensetzung des Algenmediums (nach Nicklisch et al. 2008); Endkonzentration: 2 µmol/l Fe, 4 µmol/l EDTA, 2.16 mMl HCO_3, N:P = 20. Die Spurenelemente sind alle in Endkonzentration angegeben.

Substanz	Konzentration im Nährmedium
Makroelemente	mM
$CaCO_3$	0,90
$Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$	0,50
$MgSO_4 * 7 H_2O$	0,25
KCl	0,10
KH_2PO_4	0,01
HCl	0,20
Spurenelemente	µM
H_3BO_3	4,00
$Mn SO_4 * 4H_2O$	0,80
$ZnSO_4 * 7H_2O$	0,08
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	0,04
$CuSO_4 * 5H_2O$	0,04
$AlK(SO_4)_2 * 12 H_2O$	0,08
$CoCl_2 * 6H_2O$	0,04
$NiSO_4 * 7H_2O$	0,04
KBr	0,08
KJ	0,04
H_2SeO_3	0,06
Eisen-EDTA-Lösung	mM
Na_2-EDTA	2,00
Fe-EDTA	1,00

Die Algenkulturgefäße wurden mit Algenmedium befüllt, mit einer kleinen Menge (ca. 20 ml) der Stammkultur der verwendeten Alge angeimpft und dann mit einem Silikonstopfen verschlossen. In den Silikonstopfen wurden zwei Löcher gestochen: ein Loch für die Luftabfuhr (über ein zweifach rechtwinklig gebogenes Glasröhrchen), das zweite Loch war über Schläuche und Filtervorsatz (Midisart 2000, 2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen) mit einer Gasförderpumpe (VEB ELMET HETTSTEDT, DDR) verbunden. Die zugeführte Luft wurde durch Aktivkohle, Glaswolle und Filtervorsätze gereinigt. Die Algen wurden in einer *batch*-Kultur (diskontinuierliche Kultur, Abbildung 7) nach Kohl und Nicklisch (1988) unter Standardlaborbedingungen im Daphnienzuchtraum kultiviert. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren (Cool white und Warm white, L36 W/20 von Osram, München, Deutschland) mit Lichtintensität von ca. 50 µmol Photonen m^{-2} sec^{-1}. Um möglichst gleichmäßig stabile Qualität der verwendeten Futteralgen zu halten, wurden die Algen während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

Die durch Ernten gewonnene Algensuspension wurde im Kühlschrank (dunkel, 6 °C) bzw. in der Kühlzelle (6-7 °C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Fütterung der Versuchstiere erfolgte alle 2 Tage *ad libitum*.

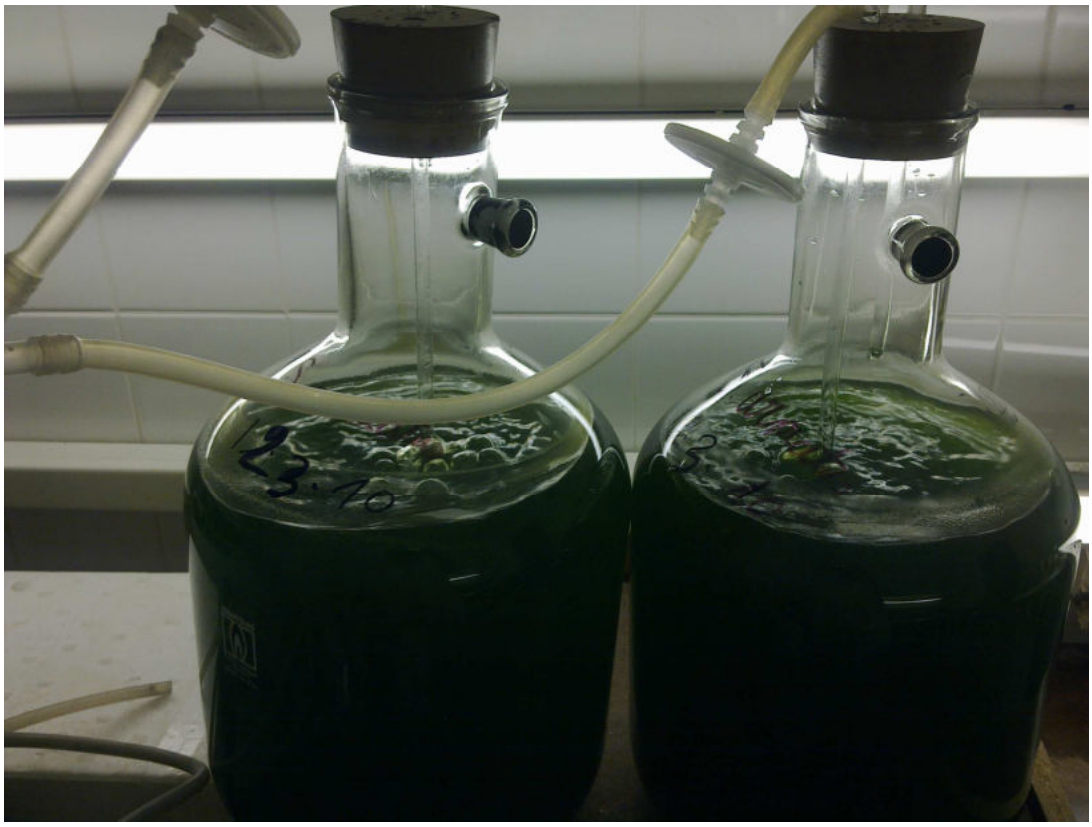

Abbildung 7: Algenzuchtanlage am Beispiel der *batch*-Kultur der Alge *D. armatus*

2.2.5 Vorbereitung der Futteralgen für die Analysen

Die Qualität der Futteralgen ist von verschieden Parameter abhängig (siehe Einleitung). In der vorliegenden Arbeit wurde die Qualität der Futteralge anhand der wichtigsten Qualitätsparameter ermittelt: die Zusammensetzung der Fettsäuren, Aminosäuren und der Nährstoffe. Für die Bestimmung der Fettsäure-, Aminosäure- und Nährstoff-Zusammensetzung der Futteralgen wurden die Suspension jeder Futteralge geschüttelt und in acht 50ml Tubes überführt, dann für 20 Minuten bei 3000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Sepatech Megafuge 1,0) und bis auf ca. 5 ml dekantiert. Die dekantierten Proben wurden auf 50 ml mit Algensuspension aufgefüllt, erneut zentrifugiert und dekantiert. Durch das Zentrifugieren der Suspensionen wurden die Algen von den ebenfalls in den Kulturen wachsenden Bakterien getrennt, die mit dem Überstand

dekantiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Konzentrat wurde zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und jeweils 15-20 Minuten lang bei 3000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde das Algen-Konzentrat in die Reaktions-Gefäße (Eppendorf) überführt und im Gefrierschrank (Quelle Privileg) bei –30°C gelagert. Für die Bestimmung der Fettsäure-Zusammensetzung der Futteralgen wurde das gefrorene Algen-Konzentrat jeder Futteralge in der Firma Lipidomix GmbH Berlin analysiert. Für die Bestimmung der Nährstoff-Zusammensetzung der Futteralgen wurde das gefrorene Algen-Konzentrat jeder Futteralge in einem Gefriertrockner (Christ Alpha 1-4, B Braun) eine Nacht lang gefriergetrocknet (-20 °C unter Vakuum) und für 5 min gemahlen (Mühle der Marke Retsch MM2000), dann im zentralen analytischen Labor ZAL der Universität BTU Cottbus bearbeitet. PO_4 wurde nach DIN 38405 Teil 11 (HNO_3 Druckaufschluss) bestimmt[10]. Der Kohlenstoff und der Stickstoff wurden im Labor des Lehrstuhls Bodenschutz der BTU Cottbus mit Hilfe eines Gerätes CNS-Elementaranalyzer (Vario EL III) bestimmt. Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip der katalytischen Verbrennung unter Sauerstoffzufuhr und hohen Temperaturen (1180°C). Die Verbrennungsgase werden mit Hilfe von spezifischen Adsorptionssäulen voneinander getrennt und nacheinander mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) bestimmt. Als Spül- und Trägergas dient Helium. Für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Futteralgen wurde das gefrorene Algen-Konzentrat gefriergetrocknet und dann in der Firma SGS Germany GmbH mit Hilfe eines Aminosäuresequenzanalysators analysiert. Aminosäurezusammensetzung (Aminosäuresequenz) von Peptiden und Proteinen werden automatischen bestimmt. Letztere werden dazu in einem ersten Schritt durch starke Säurebehandlung oder Proteasen vollständig zu den Aminosäuren abgebaut. Die entstehenden Aminosäuregemische werden anschließend durch den Aminosäureanalysator zu den 20 proteinogenen Aminosäuren aufgetrennt, wobei deren relative Mengen automatisch bestimmt werden. Die Auftrennung der Aminosäuregemische erfolgt durch Säulen-Chromatographie an Kationenaustauschern, die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren durch Messung der Farbintensität der Ninhydrin-Reaktion (Moor 1968).

[10] DIN 38405 Teil 11 ist eine frühere Ausgabe der ISO 6878: 2004

Die Zentrifuge und der Gefriertrockner wurden freundlicherweise von Prof. R. Ehwald über Frau Dr. Y. Pörs (Arbeitgruppe der Zellbiologie des Instituts für Biologie an der Humboldt Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.3 Huminstoff

In diesem Abschnitt wird die Testsubstanz näher charakterisiert. Als Prüfhuminstoff wurde HuminFeed® (Humintech GmbH, Düsseldorf, Deutschland)[11] ausgesucht. HuminFeed® wurde durch eine alkalische Extraktion aus hoch oxydierter Braunkohle gewonnen. Er liegt als Feststoff vor und enthält 43% organischen Kohlenstoff. HuminFeed® hat in gelöster Form eine spezifische UV-Absorption von 12.5 L mg^{-1} m^{-1} und enthält 82% Huminstoffe, 18% niedermolekulargewichtige Komponenten und keine Polysacharide, was eine Aufnahme durch den Organismus begünstigt (Meinelt et al. (2007). Das könnte erklären, warum die exponierten Versuchstiere gegenüber HuminFeed® dunkler als die Versuchstiere im Kontrollansatz waren.

Effekte von HuminFeed® wurden in verschieden Studien schon geprüft (z. B. Bouchnak & Steinberg 2010, Euent et al. 2008, Steinberg et al. 2008, Steinberg et al. 2010a, 2010b). Eine detaillierte Beschreibung des Stoffes sowie die Ergebnisse der Elementaranalyse als auch der chemischen Parameter von HuminFeed® ist in Meinelt et al. (2007) zu finden. Die chemische Charakterisierung von HuminFeed® zeigte, dass HuminFeed® ein Natriumsalz der Huminsäure ist[12]. Eine Strukturformel von HuminFeed® ist bisher nicht entwickelt worden. Er gehört aber zur Klasse der Fulvinsäure (mündliche Mitteilung Prof. Steinberg).

Während der Versuche wurde stets mit einer Stammlösung von HuminFeed® (HF) mit einer Konzentration von 1g/l HF (entspricht 35,83 mM DOC, siehe Tabelle 8) gearbeitet. Zur Herstellung dieser Stammlösung wurde 0.5 g HuminFeed® in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Um den Lösungsvorgang zu unterstützen, wurde der mit HuminFeed® und destilliertem Wasser gefüllte Kolben auf einen

[11] Die Verwendung vom HuminFeed® soll keine Werbung für dieses Produkt sein.
[12] Weitere Informationen über die allgemeinen Eigenschaften und die Angabe der Bestandteile von HuminFeed® siehe unter: http://www.humintech.com/001/animalfeeds/products/huminfeed.html

Magnetrührer (VEB Labortechnik Ilmenau, Deutschland) für ca. 30 min gestellt. Dann wurde die HuminFeed®-Stammlösung im Kühlschrank (dunkel, 6 °C) bzw. in der Kühlzelle bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

In den Versuchen wurde HuminFeed® in unterschiedlichen Konzentrationen (0; 0,18; 0,54; und 1,08 mM DOC für *Moina*-Arten und 0; 0,18; 0,36; 0,72 und 1,43 mM DOC für *Daphnia*-Arten) dem Daphnienmedium mit der entsprechenden Futteralge des Versuchs zugesetzt. Die entsprechende Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs DOC ist in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: HuminFeed®-Konzentration in mg/l DOC und mM DOC. HF= HuminFeed®, DOC = gelöster organischer Kohlenstoff.

mg/l HF	mg/l DOC	mM DOC
1	0,43	0,04
5	2,15	0,18
10	4,3	0,36
15	6,45	0,54
20	8,6	0,72
30	12,9	1,08
40	17,2	1,43
1000	430	35,83

Zur Herstellung der Testlösungen mit den festgelegten Konzentrationen wurde das entsprechende Volumen der HuminFeed®-Stammlösung dem 1L Daphnienmedium zugeführt. Das bedeutet zum Beispiel, dass 5 ml der HuminFeed®- Stammlösung für die 5 mg/l HuminFeed®-Konzentration zugesetzt wurde.

2.4 Daphnienmedium

Das Daphnienmedium (**A**achener **D**aphnien **M**edium ADaM) wurde in vier 5-Liter Glasflaschen hergestellt und erfolgte wie von Klüttgen et al. (1994) beschrieben. Es basiert auf synthetischem Meersalz (Wiegandt GmbH, Deutschland), das

bereits die meisten Substanzen in der notwendigen Menge enthält, und in destilliertem Wasser mit zusätzlichen Chemikalien gelöst wird. Um die eventuelle Versauerung (pH-Wert-Absenkung) durch HuminFeed®-Zugabe oder Metabolite von den Wasserflöhen abzupuffern, wurde eine 10 mal höhere Natriumhydrogencarbonatkonzentration verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Daphnienmedium ADaM (nach Klüttgen et al. 1994, modifiziert).

Chemikalien	Endkonzentration (mg/l)	Molarität (mM)
Synthetisches Meersalz	333 Meersalz	
Kalziumchlorid	270,48 $CaCl_2 . 2H_2O$	1,85
Natriumhydrokarbonat	500 $NaHCO_3$	5,95
Selendioxid	0,0014 SeO_2	0,000013

2.5 *Daphnia magna* STRAUS 1820

D. magna gehört zur Familie Daphniidae (zur Taxonomie siehe Tabelle 10). Die hier verwendeten Wasserflöhe der Art *D. magna* stammten aus einem Laborklon, welcher ursprünglich aus dem Umweltbundesamt Berlin bezogen wurde.

Tabelle 10: Taxonomie von *Daphnia magna*[13]

Suborder Cladocera Latreille, 1829 - Cladocerans
Infraorder Anomopoda Stebbing, 1902
Family Daphniidae Straus, 1820
Genus *Daphnia*™ O.F. Müller, 1785
Daphnia magna Straus, 1820

Um die Effekte der Qualität der Futteralgen auf die Lebensparameter von *D. magna* unter chemischem Stress ausgelöst durch HuminFeed® in umweltrelevanten Konzentrationen testen zu können, sind die folgenden Versuchsansätze konzipiert worden:

[13] Taxonomie von *D. magna* ist bei: Systema Naturae 2000 unter:
http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=33105 stand am 14.10.09

2.5.1 *Daphnia magna* auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

In der eigenen Masterarbeit (Bouchnak 2009) wurde ein Versuch von *D. magna* bei Fütterung mit der Futteralge *P. subcapitata* durchgeführt. Da dieser Versuch bei gleichen Laborbedingungen wie die Versuche der vorliegenden Arbeit und ebenfalls mit dem identischen Stamm der Art *D. magna* und dem Prüfhuminstoff HuminFeed® durchgeführt wurden, wurden die Daten für die Lebensparameter von *D. magna* bei Fütterung mit *P. subcapitata* von der Masterarbeit (Bouchnak 2009) verwendet.

2.5.2 *Daphnia magna* auf *Monoraphidium minutum*

Zum Beginn der Versuche von *D. magna* bei der Fütterung mit der Alge *M. minutum* wurden zwei adulte eiertragende Weibchen (0.Generation) von der Stammkultur des Wasserflohs *D. magna*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert wurden, entnommen und als Vorkultur angesetzt und mit der Alge *M. minutum* gefüttert. Bis zur 3.Generation wurde die Vorkultur weiterkultiviert und dabei mit der Alge *M. minutum* weitergefüttert, um sowohl die maternalen Effekte zu minimieren als auch eine genügende Anzahl neugeborener Wasserflöhe zu gewährleisten, denn es wurden 250 gleich alte neugeborene Weibchen für den Versuch benötigt und damit ging dem eigentlichen Versuch die Zucht auf Biomasse voraus. Die Wasserflöhe der 3. Generation wurden für den Versuch verwendet (Tabelle 11). In diesem Versuch wurden parallel fünf Ansätze mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,36; 0,72 und 1,43 mM DOC) getestet, um die Relation zwischen die HuminFeed®-Konzentrationen und HuminFeed®-Effekte herauszufinden. Dabei stand die Frage: Führen zunehmende Konzentrationen an Huminstoff zu zunehmenden Effekten? im Mittelpunkt dieses Ansatzes. Bei den eingesetzten Wasserflöhen handelte es sich jeweils um 5 neugeborene (≤ 24 h alt) Versuchstiere in einem Kolben mit einem Volumen von 100 ml. Für jeden Ansatz wurden zehn Replikate angesetzt. Das experimentelle Design bestand also aus: 5 verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen x 5 je Versuchstiere x jeweils 10 Replikate = 250 Versuchstiere in fünfzig 100 Milliliter-Kolben für fünf verschiedene Ansätze. Das weibliches Geschlecht aller Versuchstiere wurde geprüft. Im Intervall von zwei Tagen wurden die

Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit *M. minutum ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert.

Tabelle 11: Verlauf der Vorkultur von *D. magna* bei der Fütterung mit *M. minutum.*

Generation	Zahl der weiblichen Wasserflöhe
0. G	2
1. G	22
2. G	200
3. G	> 800, für den Versuch verwenden

2.5.3 *Daphnia magna* auf *Desmodesmus armatus*

Um eine reine Population entstehen zu lassen, wurde zu Beginn des Versuches von *D. magna* bei der Fütterung mit der Alge *D. armatus* ein eiertragendes Weibchen (0.Generation) von der Stammkultur des Wasserflohes *D. magna*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert wurde, entnommen und als Vorkultur angesetzt und mit der Alge *D. armatus* gefüttert. Bis zur 8. Generation wurde die Vorkultur weiterkultiviert (12 Wochen) und dabei mit der Alge *D. armatus* weitergefüttert. Es war geplant, ein Multigenerationsversuch anzusetzen, um die in der Einleitung erwähnte Frage, ob es einen Transgenerationseffekt von HuminFeed® auf *D. magna* gibt oder nicht, zu beantworten. Die HuminFeed®-Konzentration 0,72 mM DOC (entspricht 8,6 mg/l DOC, siehe Tabelle 8) ist eine umweltrelevante Konzentration und hat in einem Vorversuch signifikante Unterschiede zur Kontrolle erzielt, deshalb wurde sie in den Filialgenerationsversuchen verwendet. In einem Parentalgenerationsversuch wurden parallel fünf Ansätze mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,36; 0,72 und 1,43 mM DOC) getestet. Fünf neugeborene (≤ 24 h alt) Wasserflöhe der 8. Generation sind in einem Kolben mit einem Volumen von 100 ml eingesetzt worden (Abbildung 8). Pro Ansatz gab es zehn Wiederholungen, so dass 50 Wasserflöhe auf zehn Kolben je Ansatz verteilt wurden. Insgesamt wurde der Parentalgenerationsversuch P mit 250 Versuchstieren gestartet. Erst am Tag 11 des Parentalgenerationsversuchs haben die Versuchstiere die erste Brut entlassen. Vom Kontrollansatz (0 mM DOC) und vom Ansatz mit 0,72 mM DOC

des Parentalgenerationsversuchs P wurden neugeborene Wasserflöhe der ersten Brut für den Filialgenerationsversuch F1 verwendet. Entsprechend des Ansatzes, aus dem sie stammten, wurde dem Daphnienmedium der HuminFeed® in der vorgesehenen Konzentration zugesetzt: 0 mM DOC (Kontrolle K1) und 0,72 mM DOC. Außerdem wurden neugeborene Wasserflöhe der ersten Brut des Ansatzes mit 0,72 mM DOC vom Parentalgenerationsversuch ohne HuminFeed® als Pseudokontrolle PK1 im Filialgenerationsversuch F1 angesetzt, um zu testen, ob die HuminFeed®-Effekte, falls sie vorhanden sind, weitergegeben werden können, wenn die Versuchstiere nicht mehr gegen HuminFeed® exponiert werden. Damit handelte es sich im Filialgenerationsversuch F1 um drei Ansätze (K1; PK1 und 0,72 mM DOC) (siehe Abbildung 9). Pro Ansatz waren zehn Kolben mit je fünf Versuchstieren vorhanden, so dass mit 150 Versuchstieren im Filialgenerationsversuch F1 gearbeitet wurde.

Abbildung 8: Anordnung des Multigenerationsversuchs von *D. magna* auf *D. armatus*

Um feststellen zu können, ob der eventuell vorhandene Effekt des HuminFeed® im Filialgenerationsversuch F1 dauerhaft ist oder nicht, wurde ein Filialgenerationsversuch F2 angesetzt. Als Versuchstiere für den Filialgenerationsversuch F2 wurden neugeborene Wasserflöhe der ersten Brut des Filialgenerationsversuchs F1 verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese neugeborenen Wasserflöhe für den Ansatz verwendet wurden, deren

HuminFeed®-Konzentration gleich dem Ansatz war, aus dem sie stammten. Demnach wurden drei Ansätze vorbereitet: 0 mM DOC (Kontrolle = K2), 0 mM DOC (Pseudokontrolle = PK2) und einen Ansatz mit 0,72 mM DOC (siehe Abbildung 9). Für den Filialgenerationsversuch F2 waren ebenfalls zehn Kolben mit je fünf Versuchstieren pro Ansatz vorhanden. Das weibliche Geschlecht aller Versuchstiere aller Versuche wurde geprüft. Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Versuche umgesetzt und *ad libitum* mit der Alge *D. armatus* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert.

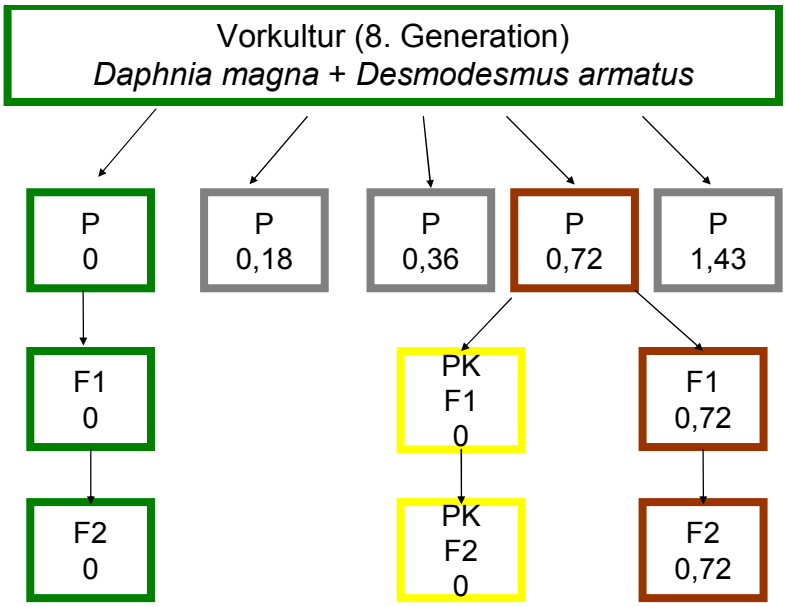

Abbildung 9: Schema des Designs für den Multigenerationsversuch von *Daphnia magna*. P: Parentalgenerationsversuch, F1 Filialgenerationsversuch 1, F2 Filialgenerationsversuch 2, PK: Pseudokontrolle. Alle Konzentrationen sind in mM DOC.

2.6 *Daphnia galeata* SARS 1864

D. galeata gehört zur Familie Daphniidae (zur Taxonomie siehe Tabelle 12). Die hier verwendeten Wasserflöhe der Art *D. galeata* stammten von einem Laborklon, welcher ursprünglich aus dem Müggelsee (Berlin, Deutschland) isoliert wurde (Institut für Ökologie, Humboldt Universität zu Berlin, Deutschland).

Tabelle 12: Taxonomie von *Daphnia galeata*[14]

Suborder Cladocera Latreille, 1829 - Cladocerans
Infraorder Anomopoda Stebbing, 1902
Family Daphniidae Straus, 1820
Genus *Daphnia*™ O.F. Müller, 1785
Daphnia galeata Sars, 1864

Um die Effekte der Qualität der Futteralgen auf Lebensparameter von *D. galeata* unter chemischem Stress durch HuminFeed® in umweltrelevanten Konzentrationen testen zu können, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

2.6.1 *Daphnia galeata* auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

Für den Versuch von *D. galeata* bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* wurden 250 neugeborene (≤ 24 h alt) Wasserflöhe benötigt. Aus diesem Grund ging diesem Versuch die Zucht der Biomasse voraus. Von der Stammkultur des Wasserflohs *D. galeata*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert werden, wurden 30 eiertragende Weibchen (1.G) entnommen und als Vorkultur für diesen Versuch angesetzt und mit der Alge *P. subcapitata* gefüttert. Das Verfahren wurde bis zur 3. Generation beibehalten (siehe Tabelle 13). 250 neugeborene (≤ 24 h alt) Wasserflöhe der 3. Generation wurden in fünf Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,36; 0,72 und 1,43 mM DOC) verteilt. 50 Wasserflöhe wurden auf zehn 100ml Kolben je Ansatz überführt. Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *P. subcapitata ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert. Zur statistischen Absicherung wurde dieser Versuch einmal wiederholt.

Tabelle 13: Verlauf der Vorkultur von *D. galeata* bei der Fütterung mit *P. subcapitata*

Generation	Zahl der weiblichen Wasserflöhe
1. G	30
2. G	90
3. G	> 300, für den Versuch verwenden

[14] Taxonomie von *D. galeata* bei Systema Naturae 2000
http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=33102&tree=0.1 stand am 14.10.09

2.6.2 *Daphnia galeata* auf *Monoraphidium minutum*

Zum Beginn der Versuche von *D. galeata* bei der Fütterung mit der Alge *M. minutum* wurden 25 eiertragende Weibchen (0. Generation) von der Stammkultur des Wasserflohes *D. galeata*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert wird, entnommen und als Vorkultur angesetzt und mit der Alge *M. minutum* gefüttert. Bis zur 3.Generation wurde die Vorkultur weiterkultiviert und dabei mit der Alge *M. minutum* weitergefüttert, um sowohl die maternalen Effekte zu minimieren als auch eine genügende Anzahl neugeborener Wasserflöhe zu haben, denn es wurden 250 gleich alte neugeborene (< 24 h alt) Weibchen für den Versuch benötigt. Die Wasserflöhe der 3. Generation wurden für den Versuch verwendet (Tabelle 14). In diesem Versuch wurden parallel fünf Ansätze mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,36; 0,72 und 1,43 mM DOC) getestet. 50 neugeborene (< 24 h alt) Wasserflöhe wurden auf zehn 100ml Kolben je Ansatz verteilt.

Tabelle 14: Verlauf der Vorkultur von *D. galeata* bei der Fütterung mit *M. minutum*

Generation	Zahl der weiblichen Wasserflöhe
0. G	25
1. G	≥ 50
2. G	≥ 90
3. G	≥ 300 für den Versuch verwenden

Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *M. minutum ad libitum* (50 -100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert. Zur statistischen Absicherung wurde dieser Versuch zweimal durchgeführt.

2.6.3 *Daphnia galeata* auf *Desmodesmus armatus*

Zum Beginn der Versuche von *D. galeata* bei der Fütterung mit der Alge *D. armatus* wurden 30 eiertragende Weibchen (0. Generation) von der Stammkultur des Wasserflohes *D. galeata*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert wird, entnommen und als Vorkultur angesetzt und mit der Alge *D. armatus* gefüttert. Nach zwei Tagen wurden die Wasserflöhe der 0.Generation ihre Brut entlassen (1.

Generation, N ≥ 80). Die Tiere der 1. Generation sind alle nach nur 4 Tagen gestorben. In andren Vorkulturen konnten die stets adulten Weibchen der 0. Generation mehrere Bruten produzieren, aber die neugeborene Tiere (1. Generation) sind immer kurz nach dem Geburt (2-3Tage) gestorben. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Ergebnisse durch *D. armatus* als kolonienbildende Alge beeinflusst werden, wurde versucht, die Kolonie der Alge zu zerstören. Die Algensuspension wurde in Ultraschall (Bandelin Sonerex Super RK255 H) für 15 Minuten behandelt. Die mit den im Ultraschall behandelten bzw. zerstörten Algen gefütterten Wasserflöhe der Art *D. galeata* einer neuen Vorkultur ergaben keine anderen Ergebnisse als die oben beschriebenen Vorkulturen. Damit waren die Versuchsansätze von *D. galeata* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* erfolglos.

2.7 *Moina macrocopa* STRAUS 1820

M. macrocopa gehört zur Familie Moinidae (zur Taxonomie siehe Tabelle 15). Die hier untersuchten Wasserflöhe der Art *M. macrocopa* wurden im Februar 2008 aus einer Regenpfütze in der Nähe des Gebäudes des Landwirtschaftsministeriums in Rio de Janeiro / Brasilien mit einer leeren Wasserflasche entnommen (Elmoor-Loureiro et al. 2010). Im Laboratório de Limnologia/ **U**niversidade **F**ederal do **R**io de **J**aneiro UFRJ/ Brasilien wurden die Tiere über mehrere Generationen in käuflichem Mineralwasser gehalten und damit akklimatisiert. Die Bestimmung erfolgte von einem Taxonomen der UFRJ. Jayme M. Santangelo Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) hat die Tiere nach Deutschland gebracht und dem Labor der Arbeitgruppe Stress- und Gewässerökologie an der Humboldt Universität zu Berlin zur Verfügung gestellt. Seit dem Sommer 2008 wurden die Wasserflöhe dieser Art *M. macrocopa* im Labor der Arbeitgruppe Stress- und Gewässerökologie an der Humboldt Universität zu Berlin als Stammkultur im ADaM kultiviert und mit der Futteralge *P. subcapitata* gefüttert.

Tabelle 15: Taxonomie von *Moina*[15]

Biota
Domain Eukaryota - Eukaryotes
Kingdom Animalia Linnaeus, 1758 - Animals
Subkingdom Bilateria (Hatschek, 1888) Cavalier-Smith, 1983 - Bilaterians
Branch Protostomia Grobben, 1908 - Protostomes
Infrakingdom Ecdysozoa Aguinaldo et al., 1997 ex Cavalier-Smith, 1998 Ecdysozoans
Superphylum Panarthropoda
Phylum Arthropoda Latreille, 1829 - Arthropods
Subphylum Mandibulata Snodgrass, 1938
Infraphylum Crustaceomorpha (Chernyshev, 1960)
Superclass Crustacea Pennant, 1777 - Crustaceans
Epiclass Eucrustacea
Class Branchiopoda Latreille, 1817 - Branchiopods
Family Moinidae Goulden
Genus *Moina*™ Baird, 1850
Moina macrocopa Straus, 1820, *Moina micrura* Kurz, 1874

Um die Effekte der Qualität der Futteralgen auf Lebensparameter von *M. macrocopa* unter chemischem Stress ausgelöst durch HuminFeed® in umweltrelevanten Konzentrationen testen zu können, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

2.7.1 *Moina macrocopa* auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

Da in der Stammkultur des Wasserflohs *M. macrocopa* die Futteralge mehrmals umgestellt wurde, wurde für den Versuch von *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* versucht, eine reine Population zu kultivieren. Deshalb wurde ein Weibchen (1. Generation) von der Stammkultur entnommen und als Vorkultur angesetzt. Die Vorkultur wurde bis zur 5. Generation weiterkultiviert und dabei mit der Alge *P. subcapitata* gefüttert (siehe Tabelle 16). 200 neugeborene (≤ 24 h alt) Wasserflöhe der 5. Generation wurden in vier Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,54 und 1,08 mM DOC) verteilt. 50

[15] Taxonomie von Moina-Arten bei Systema Naturae 2000 unter:
http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=33107 stand am 14.10.09

Versuchstiere wurden auf zehn 100ml Kolben je Ansatz aufgeteilt (5 Versuchstiere pro 100ml Kolben).

Tabelle 16: Verlauf der Vorkultur von *M. macrocopa* bei der Fütterung mit *P. subcapitata*

Generation	Zahl der weiblichen Wasserflöhe
1. G	1
2. G	4
3. G	30
4. G	80
5. G	≥ 250, für den Versuch verwenden

Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *P. subcapitata ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert. Zur statistischen Absicherung wurde dieser Versuch einmal wiederholt.

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Ergebnisse durch Dichtestress beeinflusst werden, ist in einem **zusätzlichen Versuch** jedes Weibchen der Vorkultur (≤ 24 h alt) in einen Kolben mit einem Volumen von 100 ml allein überführt worden. Das Versuchdesign bestand aus 4 Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,54 und 1,08 mM DOC). Pro Ansatz wurden zehn Kolben gefertigt, so dass letztendlich mit 40 Versuchstieren in dieser Versuchsreihe gearbeitet wurde.

2.7.2 *Moina macrocopa* auf *Monoraphidium minutum*

Zu Beginn des Versuchs mit *M. macrocopa* bei der Fütterung mit der Alge *M. minutum* wurden 25 junge Weibchen (0. Generation) von der Stammkultur des Wasserflohes *M. macrocopa*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert wird, entnommen und als Vorkultur angesetzt und mit der Alge *M. minutum* gefüttert. Bis zur 3. Generation wurde die Vorkultur weiterkultiviert und dabei mit der Alge *M. minutum* weitergefüttert, um sowohl die maternalen Effekte zu minimieren als auch eine genügende Zahl an neugeborenen Wasserflöhen zu erhalten, denn es wurden 200 gleich alte neugeborene (< 24 h alt) Weibchen für einen Versuch

benötigt (siehe Tabelle 17). Das Versuchdesign bestand aus 4 Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,54 und 1,08 mM DOC). 50 Versuchstiere wurden auf zehn 100ml Kolben je Ansatz verteilt (5 Versuchstiere pro 100ml Kolben).

Tabelle 17: Verlauf der Vorkultur von *M. macrocopa* bei der Fütterung mit *M. minutum*

Generation	Zahl der weiblichen Wasserflöhe
0. G	25
1. G	≥ 100
2. G	≥ 200
3. G	≥ 500, für den Versuch verwenden

Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *M. minutum ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert. Zur statistischen Absicherung wurde dieser Versuch zweimal durchgeführt.

2.7.3 *Moina macrocopa* auf *Desmodesmus armatus*

Zum Beginn des Versuchs von *M. macrocopa* bei Fütterung mit *D. armatus* wurden etwa 70 Weibchen (0. Generation) von der Stammkultur, die regelmäßig mit der Alge *P. subcapitata* gefüttert wurde, entnommen und als eine Vorkultur des Versuchs angesetzt. Die Wasserflöhe der Vorkultur wurden regelmäßig umgesetzt und mit der Alge *D. armatus* gefüttert. Dabei wurden die Mütter entfernt und die Nachkommen weiterkultiviert. Das Verfahren der Biomassezucht wurde bis zur 3. Generation beibehalten. 200 neugeborene (≤ 24 h alt) Wasserflöhe der 3. Generation wurden in vier Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed® Konzentrationen (0; 0,18; 0,54 und 1,08 mM DOC) überführt. 50 Versuchstiere wurden auf zehn 100 ml Kolben je Ansatz verteilt (5 Versuchstiere pro 100ml Kolben). Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 24 ±1 °C durchgeführt, um die erhobenen Daten dieser Arbeit mit den Daten von Rauch 2009 vergleichen zu können. In der Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie wurde erstmals mit *M. macrocopa* gearbeitet und die Versuchsbedingungen ermittelt, unter denen *M.*

macrocopa eine offensichtlich hohe Fitness aufwies. Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *D. armatus ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert.

2.8 *Moina micrura* KURZ 1874

M. micrura gehört zur Familie Moinidae (zur Taxonomie siehe Tabelle 15). Die hier verwendeten Wasserflöhe der Art *M. micrura* stammten von einem Klon, welcher aus dem oligotrophen Lajes Reservoir (Piraí, Rio de Janeiro State, Brasilien) entnommen wurde und im Labor Ökophysiologie and Ökotoxikologie von Cyanobakterien UFRJ seit 2002 kultiviert wurde (Steinberg et al. 2010b). Jayme M. Santangelo von der Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) hat die Tiere nach Deutschland gebracht und dem Labor der Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie an der Humboldt Universität zu Berlin zur Verfügung gestellt. Seit dem Herbst 2008 wurden die Wasserflöhe dieser Art *M. micrura* im Labor der Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie an der Humboldt Universität zu Berlin als Stammkultur im ADaM kultiviert und mit der Futteralge *P. subcapitata* gefüttert. Um die Ergebnisse der Versuche von *M. micrura* mit den Ergebnissen der Versuche von *M. macrocopa* vergleichen zu können, wurde das Versuchsdesign der Versuche von *M. micrura* identisch zu dem Design der Versuche von *M. macrocopa* gestaltet. Um die Effekte der Qualität der Futteralgen auf Lebensparameter von *M. macrocopa* unter chemischem Stress ausgelöst durch HuminFeed® in umweltrelevanten Konzentrationen testen zu können, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

2.8.1 *Moina micrura* auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

Da in der Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie erstmals mit *M. micrura* gearbeitet wurde, wurde die Kultivierung schrittweise optimiert. Als die Stammkultur des Wasserflohs *M. micrura* am Anfang der vorliegenden Promotion übernommen wurde, ist der Stammkultur HuminFeed® in Konzentration von ca. 0,18 mM DOC zugesetzt worden, weil *M. micrura* aus einem an DOC reichen Reservoir stammte. Deshalb wurde zum Beginn des Versuchs von *M. micrura* bei

Fütterung mit *P. subcapitata* ein Weibchen (1. Generation) entnommen und als Vorkultur angesetzt, um mit einer reinen Population die Lebensparameter von *M. micrura* zu testen. Nach 31 Tagen konnten die neugeborenen Wasserflöhe der 10. Generation der Vorkultur als Versuchstiere verwendet werden (Tabelle 18). Das Versuchdesign bestand aus 4 Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,54 und 1,08 mM DOC). 50 Versuchstiere wurden auf zehn 100ml Kolben je Ansatz verteilt (5 Versuchstiere pro 100ml Kolben).

Tabelle 18: Verlauf der Vorkultur von *M. micrura* bei der Fütterung mit *P. subcapitata*

Generation	Zahl der weiblichen Wasserflöhe
1. G	1
2. G	3
3. G	3
4. G	12
5. G	24
6. G	40
7. G	60
8. G	80
9. G	≥ 100
10. G	≥ 250, für den Versuch verwenden

Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *P. subcapitata ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert. Zur statistischen Absicherung wurde dieser Versuch wiederholt. Bei der Wiederholung wurde die Vorkultur nur bis zur 5. Generation durchgeführt.

2.8.2 *Moina micrura* auf *Monoraphidium minutum*

Der Versuchsaufbau von *M. micrura* mit *M. minutum* als Futter basiert auf einer Vorkultur, die mit 30 Weibchen (0. Generation) aus der mit *P. subcapitata* gefütterten Stammkultur gestartet wurde. Die Vorkultur wurde bis zur 4. Generation durchgeführt. Neugeborene (< 24 h alt) Wasserflöhe der 4. Generation der Vorkultur wurden als Versuchstiere verwendet. Das Versuchdesign bestand

aus 4 Ansätzen mit unterschiedlichen HuminFeed®-Konzentrationen (0; 0,18; 0,54 und 1,08 mM DOC). 50 Versuchstiere wurden auf zehn 100ml Kolben je Ansatz verteilt (5 Versuchstiere pro 100ml Kolben). Im Intervall von zwei Tagen wurden die Versuchstiere aller Ansätze umgesetzt und mit der Alge *M. minutum ad libitum* (100 ml Algensuspension pro Liter) gefüttert. Zur statistischen Absicherung wurde dieser Versuch zweimal parallel durchgeführt.

2.8.3 *Moina micrura* auf *Desmodesmus armatus*

Zum Beginn der Versuche von *M. micrura* bei der Fütterung mit der Alge *D. armatus* wurden ca. 20 eiertragende Weibchen (0. Generation) von der Stammkultur des Wasserflohes *M. micrura*, die regelmäßig mit *P. subcapitata* gefüttert wurde, entnommen und als Vorkultur angesetzt und mit der Alge *D. armatus* gefüttert. Nach zwei Tagen wurden die Wasserflöhe der 0.Generation ihre Brut entlassen (1. Generation). Die Tiere der 1. Generation haben nur wenige Tage gelebt. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Ergebnisse durch *D. armatus* als Kolonien bildende Alge beeinflusst werden, wurde versucht, die Kolonie der Alge zu zerstören. Die Algensuspension wurde in Ultraschall (Bandelin Sonerex Super RK255 H) für 15 Minuten gestellt. Die mit den im Ultraschall behandelten bzw. zerstörten Algen gefütterten Wasserflöhe der Art *M. micrura* einer neuen Vorkultur ergaben keine anderen Ergebnisse als die oben beschriebenen Vorkulturen. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Ergebnisse durch Dichtestress beeinflusst werden, ist in einem Vorversuch (mit zehn neugeborenen Wasserflöhe) jeder Wasserfloh in einen Kolben mit einem Volumen von 100 ml allein überführt worden. Sie sind aber ebenfalls kurz nach dem Ansatz (2-3Tage) gestorben. Damit waren die Versuchsansätze von *M. micrura* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* erfolglos.

2.9 Datenerhebung

Bei allen Versuchen wurden Daten zur Bestimmung der Überlebensrate und der Reproduktionsrate der Versuchstiere aufgenommen. Die Versuchstiere wurden täglich kontrolliert, um die eventuelle Anzahl der toten Versuchstiere zu

protokollieren (Überlebenstest). Beim Überlebenstest wurde ein Versuchstier als tot protokolliert, wenn es sich nicht mehr bewegte. Das heißt, wenn es nicht schwimmen konnte oder sich keine Bewegungen von Anhängseln oder Postabdomen (Rückenfortsatz) innerhalb von einigen Sekunden nach vorsichtigem Hin- und Herbewegen des Prüfbehälters beobachten ließen.

Alle zwei Tage wurden die Versuchstiere umgesetzt, wobei die lebenden Nachkommen gezählt und dann entfernt wurden (Reproduktionstest). Da die Nachkommen der *Moina*-Arten relativ klein sind (≤ 0,5 mm), wurden sie mit Hilfe einer Leuchtlupe (LED-Leuchtlupe, Wetelux) detektiert. Beim Umsetzten wurden die Versuchstiere in eine weiße Photoschale überführt, mit einer zurechtgeschnitten durchsichtigen 3 ml Plastikpipette (Elkay Eireann, Ierland) vorsichtig aufgesaugt und dann in einen mit destilliertem Wasser gesäuberten Kolben wieder eingesetzt. Im Kolben befand sich frisches Daphnienmedium ADaM, welches mit entsprechenden Futteralgen und entsprechender HuminFeed®-Konzentration versetzt war. Die Photoschale und die Plastikpipette wurden vor jeder Benutzung mit destilliertem Wasser gereinigt. Die Reproduktionsleistung von Versuchstieren wird auf die folgende Weise angegeben: durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen (im gesamten Leben). Zusätzlich wurde die Anzahl der Nachkommen erfasst, die pro Weibchen und Brut ab dem ersten Tag, an dem Nachkommen festgestellt wurden, produziert wurden. Die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut wurde protokolliert. Das Alter der Versuchstiere bei der ersten Geburt wurde ebenfalls notiert. Die Reproduktionsleistung der Versuchstiere, die der Testsubstanz (HuminFeed®) ausgesetzt wurden, wurde mit der Reproduktionsleistung der Kontrolle verglichen.

2.10 Statistische Datenauswertung

Die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Daten des Reproduktionstests und des Überlebenstests wurden auf eigenen Datenblättern (Tabellen) protokolliert, dann mit Excel (Microsoft Office 2002 bzw. 2003) erfasst und als Diagramme dargestellt. Die Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen

STABW bzw. Standard Error of The Mean SEM wurden auch mit Microsoft Excel vorgenommen.

Für den Lebensdauertest eines jeden Versuchs wurden die maximale Lebensdauer, Median und mittlere Lebensdauer bewertet. Als maximale Lebensdauer gilt die Lebensspanne des am längsten lebenden Versuchstiers. Der Median gibt den Zeitpunkt an, an dem 50 % der Versuchstiere tot sind, während die mittlere Lebensdauer die Summe der einzelnen Lebensspannen geteilt durch die Anzahl der Gesamtversuchstiere ist. Des Weiteren wurde die prozentuale Änderung der Lebenserwartung im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines online verfügbaren Log Rang Tests ermittelt[16].

Für den Reproduktionstest wurde die Anzahl der Nachkommen in jedem Ansatz protokolliert, die Durchschnittswerte der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut berechnet und anschließend der Mittelwert der Nachkommen pro Weibchen (Versuchstier) und Brut für jeden Ansatz über den gesamten Versuchszeitraum ermittelt. Gezählt wurde ab dem Tag der ersten Brutanlage. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (One Way Analyse of Variance) unter Zuhilfenahme Software SigmaStat 3.5 (SigmaStat 3.5, SPSS Inc., USA) bzw. mit T-Test (Microsoft Office Excel 2003) bestimmt. Eventuelle Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurden mit Hilfe der Pearson-Beziehung (Microsoft Office Excel 2003) ermittelt. Einfache Korrelationen sowie multiple Korrelationen wurden mit Excel 2003 (Microsoft Office) berechnet.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Signifikanzniveaus standardmäßig gewählt. und lauten: $p < 0{,}05^{*}$ (signifikant, Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5%), $p < 0{,}01^{**}$ (hoch signifikant, Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1%) und $p < 0{,}001^{***}$ (höchst signifikant, Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1‰).

[16] Log Rank Test steht unter: http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/ zur Verfügung

3 Effekte des Huminstoffs HuminFeed®

Aufgrund ihrer unter Normalbedingungen stattfindenden parthenogenetischen Vermehrung, die es ermöglicht, mit genetisch identischen Individuen zu arbeiten, werden Cladoceren häufig für ökologische Studien verwendet. Zudem besitzen sie im Vergleich zu vielen anderen aquatischen Organismen eine relativ kurze Lebensspanne. Deshalb eignen sie sich hervorragend, um einen Effekt bzw. Effekte verschiedener Umweltfaktoren und Substanzen unter anderem Huminstoffe vom Schlüpfen bis zum natürlichen Absterben der Individuen zu untersuchen.

Huminstoffe können auf unterschiedlichste Art und Weise in das Leben von Organismen eingreifen. Dies geschieht auf direktem wie auch auf indirektem Weg. Welcher Effekt durch Huminstoffe in welchem Ausmaß zur Wirkung kommt, ist von der Quantität (Konzentration) und Qualität der Huminstoffe sowie der Empfindlichkeit der unter Huminstoffeinfluss befindlichen Organismen abhängig (Steinberg et al. 2006). Im Folgenden werden die Effekte des Huminstoffs HuminFeed® auf Lebensparameter von vier Arten der Cladoceren (*Daphnia magna*, *D. galeata*, *Moina macrocopa* und *M. micrura*) beschrieben und diskutieret.

3.1 *Daphnia magna*

Entsprechend der Bedeutung von *D. magna* als Standardlabortier gibt es für diesen Organismus Kenntnisse zur Wirkung sowohl zahlreicher Substanzen als auch verschiedener Umweltfaktoren bzw. Stressfaktoren. Lange Zeit wurde nur von einer indirekten Wirkungsweise der Huminstoffe auf *D. magna* ausgegangen. Gut bekannt ist zum Beispiel die Fähigkeit der Huminstoffe potentiell giftige Stoffe, wie Schwermetalle, durch Komplexbildung zu absorbieren. Sie somit für *D. magna* unzugänglich zu machen und ihre Toxizität zu senken (z. B. Oikari et al. 1992). In letzter Zeit mehren sich die experimentellen Arbeiten, die sich auf direkte Effekte von Huminstoffen auf *D. magna* konzentrieren (z. B. Bouchnak & Steinberg 2010; Steinberg et al. 2010a). Zwar konnten in diesen Studien bereits Effekte der

Huminstoffe auf *D. magna* gezeigt werden, jedoch wurden dabei nur zwei Konzentrationen (0,04 und 0,9 mM DOC) untersucht. Um realistischere Aussagen über ihre Effekte machen zu können, wurden Huminstoffe, am Beispiel des Präparates HuminFeed®, in mehreren umweltrelevanten Konzentrationen bei verschieden Futterbedingung getestet.

3.1.1 *Daphnia magna* auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

Im Rahmen eigner Masterarbeit wurden die Effekte vom HuminFeed® auf Lebensparameter von *D. magna* bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* überprüft. Die Versuchstiere wurden gegenüber zwei HuminFeed®-Konzentrationen (0,04 und 0,9 mM DOC)[17] exponiert. HuminFeed® erzielte einen positiven aber nicht signifikanten Effekt auf die Lebensspanne von *D. magna*. So lebten die exponierten Versuchstiere sowohl im Durchschnitt und im Median als auch im Maximal länger als die Kontrollversuchstiere (Bouchnak 2009).

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 10-11 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *D. magna* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug 2-3 Tage bei allen Versuchstieren. Auf die Reproduktion von *D. magna* wirkte sich HuminFeed® negativ aus. Die erhaltenen Ergebnisse waren im Verhältnis zur Kontrolle höchst signifikant ($p < 0{,}001$***; ANOVA) bei beiden HuminFeed®-Konzentrationen. *D. magna* produzierte bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* weder im Kontrollansatz noch in Ansätzen mit HuminFeed® Ephippien (Bouchnak 2009).

[17] 0,04 mM DOC entspricht 1 mg/l HuminFeed®; 0,9 mM DOC entspricht 25 mg/l HuminFeed®

3.1.2 *Daphnia magna* auf *Monoraphidium minutum*

3.1.2.1 Ergebnisse

3.1.2.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* stieg die Lebensspanne der gegenüber HuminFeed® exponierten Versuchstiere an (Abbildung 10).

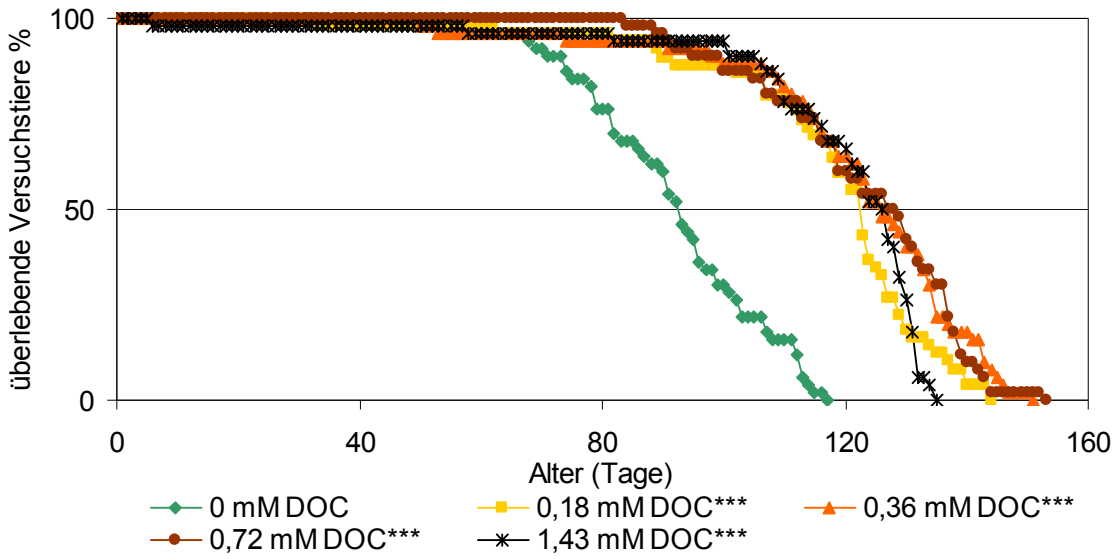

Abbildung 10: Überlebensrate von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant.

So lebten die exponierten Versuchstiere sowohl im Durchschnitt und Median als auch im Maximal höchst signifikant länger als die Kontrolltiere ($p < 0{,}001$***; Log Rank Test). Bespielweise war die maximale Lebensspanne der Kontrolltiere 116 Tage. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 70**%** der Versuchstiere aller exponierten Ansätze noch am Leben. Eine Übersicht der untersuchten Lebensspanneparameter mit den Ergebnissen ist in der Tabelle 19 dargestellt. Auffällig ist jedoch, dass sich die Effekte von HuminFeed® erst nach ca. 3 Lebenswochen auf die Reproduktion der exponierten Versuchstiere ausgeprägt haben.

Tabelle 19: Lebensdauertest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	92,3	100	91,6	100	116	100	
0,18	122,4	132,6	117,8	128,6	143	123,3	< 0,001 ***
0,36	125,5	135,9	122,5	133,6	150	129,3	< 0,001 ***
0,72	128	138,6	123,5	134,7	152	131	< 0,001 ***
1,43	126	136,5	118,9	129,7	134	115,5	< 0,001 ***

3.1.2.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 9-10 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *D. magna* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug 2-3 Tage bei allen Versuchstieren. Die Exposition gegenüber HuminFeed® führt in allen vier Behandlungsgruppen zur hoch signifikanten (bei 0,18 mM DOC) bzw. höchst signifikanten (bei 0,36; 0,72 und 1,43 mM DOC) niedrigeren Reproduktionsleistung im Vergleich zur Kontrollgruppe (p < 0,001***; ANOVA). Jedoch unterschieden sich die Reproduktionskurven bis zur dritten Versuchswoche kaum voneinander (Abbildung 11).

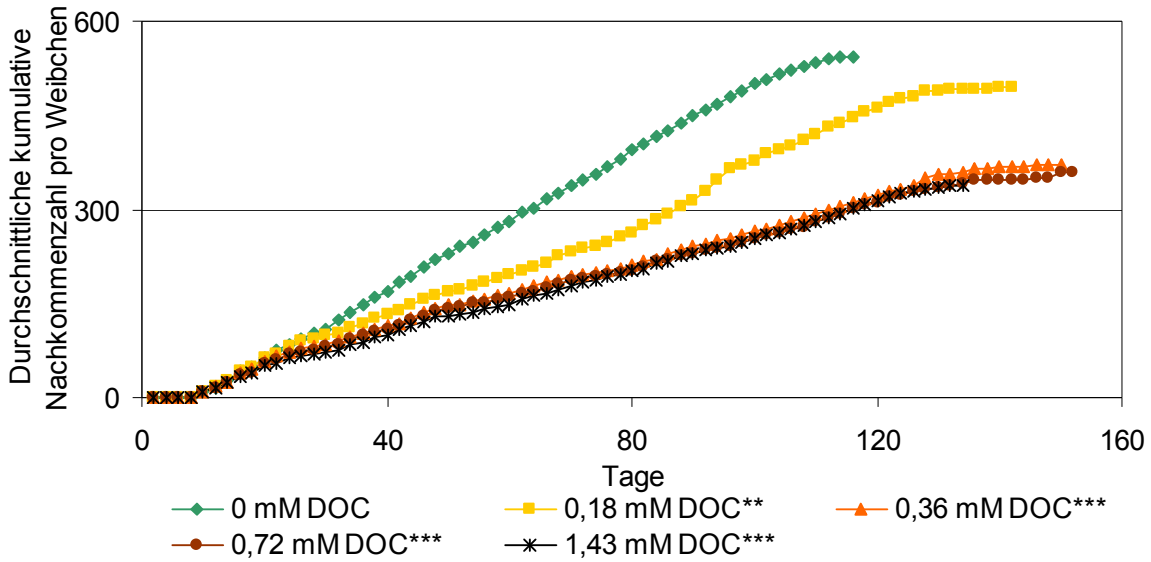

Abbildung 11: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant.

Eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 20 gezeigt. Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut wurde auch ermittelt (Abbildung 12). *D. galeata* produzierte im Kontrollansatz 45% bzw. 95% mehr Nachkommen pro Weibchen und Brut als im Ansatz mit 0,18 bzw. mit 0,36; 0,72 oder 1,43 mM DOC.

Tabelle 20: Reproduktionstest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	543	
0,18	494,8	< 0,01**
0,36	372,2	< 0,01***
0,72	359,8	< 0,001***
1,43	337,2	< 0,001***

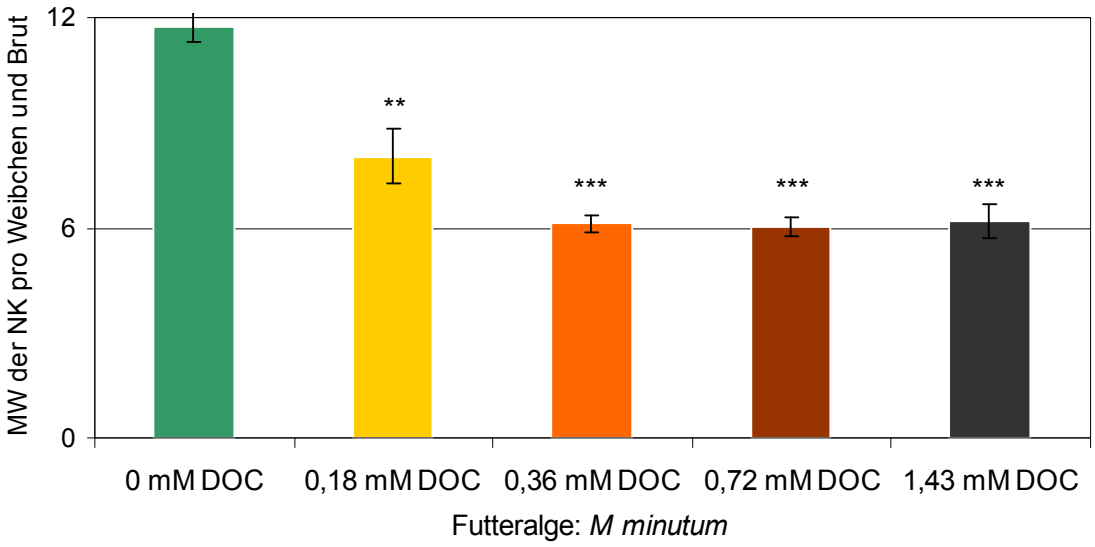

Abbildung 12: Mittelwert der Nachkommenzahl (NK) pro Weibchen und Brut von *D. magna* bei verschiedenen HuminFeed®- Konzentrationen und Futteralge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

Die gegenüber HuminFeed® exponierten Versuchstiere sahen **vitaler** aus und waren **dunkler,** aber **kleiner** als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). In diesem Versuch war es auffällig, dass sich die Quantität (Zahl pro Weibchen und Brut) und die Qualität (Große, Form und Schwimmgeschwindigkeit) der

Nachkommen der Versuchstiere (mit oder ohne HuminFeed®) in den letzten Versuchswochen verschlechtert haben.

Weiterhin kann festgestellt werden, dass *D. magna* bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* Ephippien, in Abwesenheit von Männchen, produzieren kann. Die Ephippien traten jedoch nur im Ansatz mit der höchsten HuminFeed®-Konzentration (1,43 mM DOC) im Zeitraum zwischen der 3. bis 10. Lebenswoche aber mit relativ **geringer** Zahl auf (durchschnittliche kumulative Ephippienzahl pro Weibchen ist nur 0,2 Ephippium).

3.1.2.2 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Notwendigkeit von Langzeitstudien, da der Teststoff HuminFeed® bei vielen durchgeführten Versuchen Langzeiteffekte verursachte. So traten im Versuch mit *D. magna* bei Fütterung mit *M. minutum* HuminFeed®-Effekte auf, die bei einer kürzeren Expositionsdauer nicht berücksichtigt worden wären. Wäre beispielsweise der Lebenszyklusversuch nach 21 Tagen beendet worden, so wie es in Standardtests üblich ist (OECD 1998), hätte man die auftretenden erhöhten Effekte bei den exponierten Daphnien übersehen, die erst nach ca. 3 (Reproduktion) bzw. ca. 10 Wochen (Lebensspanne) Lebenswochen erzielt wurden.

In diesem Versuch hat HuminFeed® einen **positiven** Effekt auf die Lebensspanne von *D. magna* erzielt. Dieser Effekt war in allen Ansätzen höchst signifikant (Abbildung 10, Tabelle 19). Im Reproduktionstest ist dagegen ein **negativer** Effekt vom HuminFeed® festgestellt worden (Abbildung 11). Die erhaltenen Ergebnisse waren im Verhältnis zur Kontrollgruppe im Ansatz mit 0,18 mM DOC hoch signifikant und in allen anderen exponierten Ansätzen höchst signifikant (Tabelle 20). Die Versuchstiere waren in den Ansätzen mit HuminFeed® etwas **kleiner** als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). So zeigte sich eine reziprok-proportionale Abhängigkeit der Lebensspanne bzw. des somatischen Wachstums von der Reproduktion in den Ansätzen, denen HuminFeed® zugesetzt wurde. Die hier erhaltenen Ergebnisse können daher die Annahme der „**Disposable Soma**

Theorie“ bestätigen, die besagt, dass die vorhandenen Ressourcen eines Individuums, die nicht für allgemeine metabolische Prozesse verwendet werden, dem somatischen Wachstum, der Langlebigkeit oder der Reproduktion dienen und zwischen diesen verteilt werden (Kirkwood 1977; Kirkwood & Austad 2000).

Die molekulare Grundlage dieser Theorie ist identisch mit der „**Grüne Theorie des Alterns“** von Gems und McElwee (2003) zusammengefasst und grafisch dargestellt. Diese Theorie besagt, dass durch das Trainieren des Biotransformationssystems und der antioxidativen Schutzantwort eine Lebensverlängerung bewirkt werden kann (Gems & McElwee 2003; Murphy et al. 2003). So kann möglicherweise durch die induzierte Expression von Genen, die eine wichtige Rolle im Detoxifizierungssystem spielen, der Alterungsprozess verlangsamt werden. Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel **DAF-16** beeinflussen die Reproduktionsrate und/oder die Lebensdauer eines Organismus (Gems & McElwee 2003; Yoshinaga et al. 2005). Bei Aktivierung des Transmembran-Rezeptors **IGF-1** (insulin growth faktor) wird der Transkriptions-Rezeptor DAF-16 deaktiviert. Dieser stimuliert, wenn er aktiv ist, die Bildung von heat-shock-proteins HSP, antioxidativen 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). **Huminstoffe** leiten sich unter anderem von **Polyphenolen** wie Ligninen und Tanninen ab (Leenheer & Rostad 2004; Steinberg et al. 2007). Polyphenole scheinen auf Transkriptionsfaktoren zu wirken. In Versuchen mit Quercetin, einem Polyphenol der Untergruppe Flavonoide, wurde unter anderem diese Annahme bestätigt (Kampkötter et al. 2008; Saul et al. 2008). Falls Huminstoffe wegen ihres Gehaltes an Polyphenole **deaktivierend** auf den Rezeptor IGF-1 und **aktivierend** auf DAF-16 wirkten, könnten sie die Verlängerung der Lebensdauer hervorrufen (Bouchnak & Steinberg 2010).

3.1.3 *Daphnia magna* auf *Desmodesmus armatus*

3.1.3.1 Ergebnisse

3.1.3.1.1 Parentalgeneration

3.1.3.1.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* stieg die Lebensspanne der gegenüber HuminFeed® exponierten Versuchstiere in der Parentalgeneration P an (Abbildung 13).

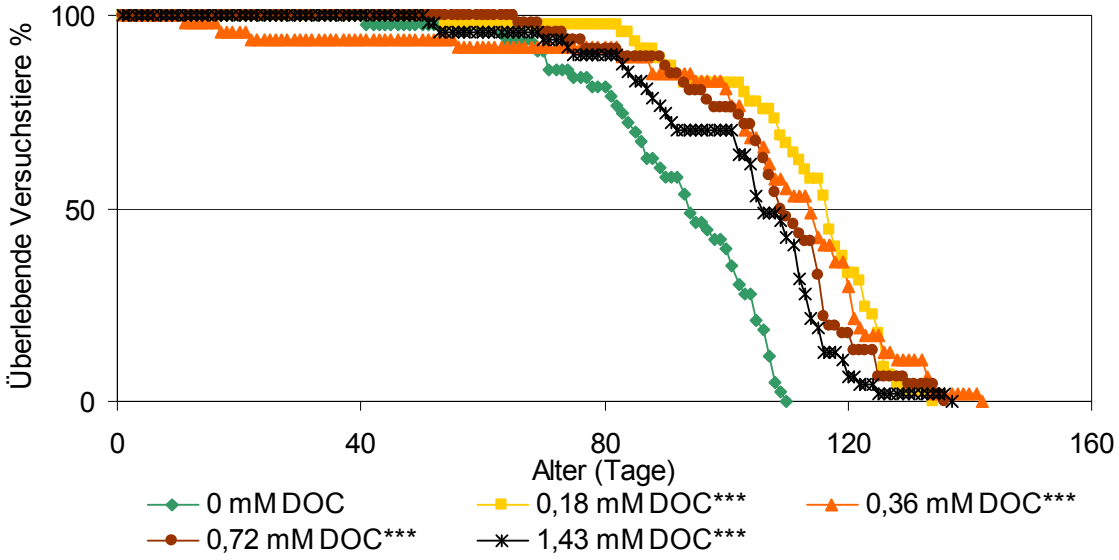

Abbildung 13: Überlebensrate von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Parentalgeneration). Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe in allen Ansätzen höchst signifikant ($p < 0{,}001$***; Log Rank Test). Eine Übersicht der untersuchten Lebensspanneparameter (mediane, durchschnittliche und maximale Lebensspanne) ist in der Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Lebensdauertest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Parentalgeneration). Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	93,7	100	91,7	100	109	100	
0,18	116,4	124,1	112,3	122,4	133	122	< 0,001 ***
0,36	113,7	121,3	106,4	116	141	129,4	< 0,001 ***
0,72	109	116,3	107,6	117,3	135	123,8	< 0,001 ***
1,43	105,7	112,8	102,5	111,7	136	124,8	< 0,001 ***

3.1.3.1.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* beeinflusste HuminFeed® weder die Dauer der Entwicklung bis zur Reife (10-11 Lebenstage) noch die Zeit zwischen zwei Bruten (2-3 Tage) von *D. magna*. Die Exposition gegenüber HuminFeed® führt in allen vier Behandlungsgruppen zur höchst signifikanten niedrigeren Reproduktionsleistungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (p < 0,001***; ANOVA). Jedoch unterschieden sich die Reproduktionskurven bis zur dritten Versuchswoche kaum voneinander (Abbildung 14).

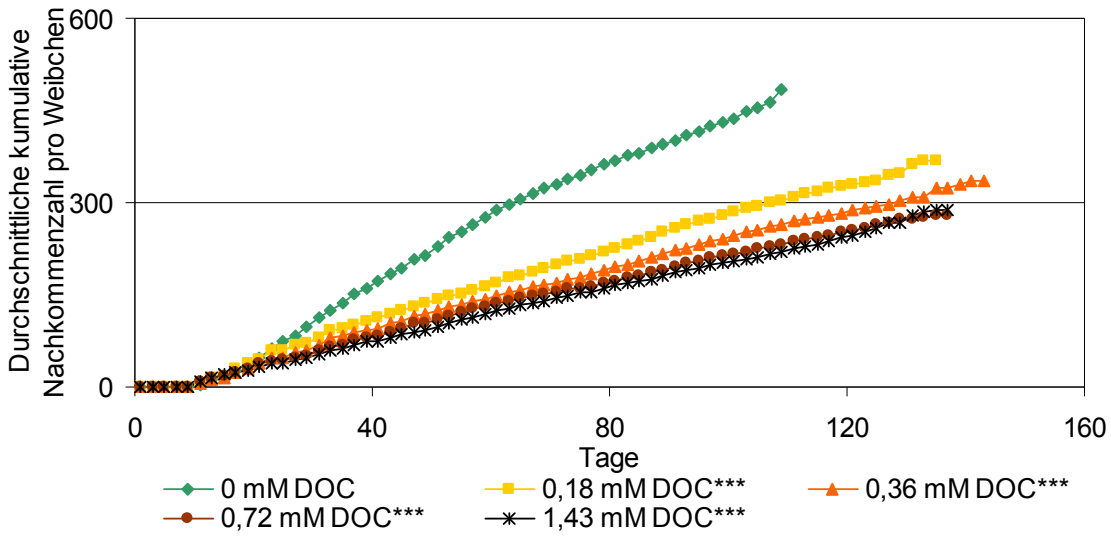

Abbildung 14: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Parentalgeneration). Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant

Die Daten in Tabelle 22 geben die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen der Parentalgeneration bei verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen an.

Tabelle 22: Reproduktionstest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Parentalgeneration). Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	483,6	
0,18	368,7	< 0,001***
0,36	335,2	< 0,001***
0,72	280	< 0,001***
1,43	287	< 0,001***

Generell lässt sich auch eine Abnahme des Mittelwerts der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut mit zunehmender HuminFeed®-Konzentration beobachten (Abbildung 15). Es konnte jedoch keine signifikante Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen festgestellt werden (Pearson-Korrelation, R= -0,76; p = 0,24).

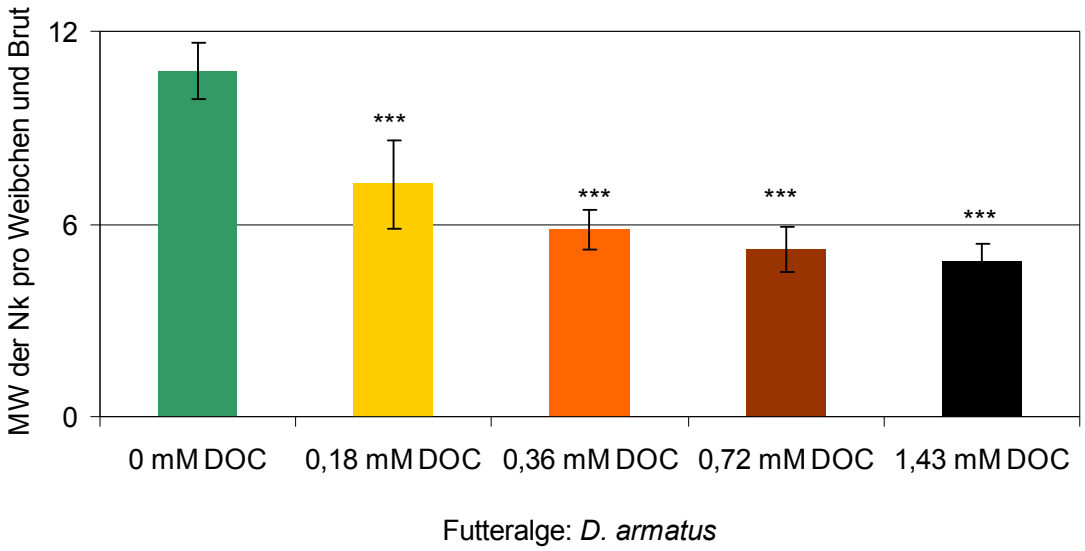

Abbildung 15: Mittelwert der Nachkommenzahl (NK) pro Weibchen und Brut von *D. magna* bei verschiedenen HuminFeed®- Konzentrationen und Futteralge D. armatus. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

Weiterhin kann festgestellt werden, dass *D. magna* bei Fütterung mit der **Alge *D. armatus*** in der Parentalgeneration Ephippien in **Abwesenheit von Männchen** produzieren kann. So haben die Versuchstiere in allen Ansätzen mit HuminFeed® Ephippien im Zeitraum zwischen der 2. bis 4. Versuchswoche produziert. Im Kontrollansatz trat **kein** Ephippium auf. Die durchschnittliche kumulative Ephippienzahl aller Ansätze wurde in Abbildung 16 dargestellt. Generell lässt sich eine Zunahme der Ephippienzahl mit zunehmender HuminFeed®-Konzentration beobachten.

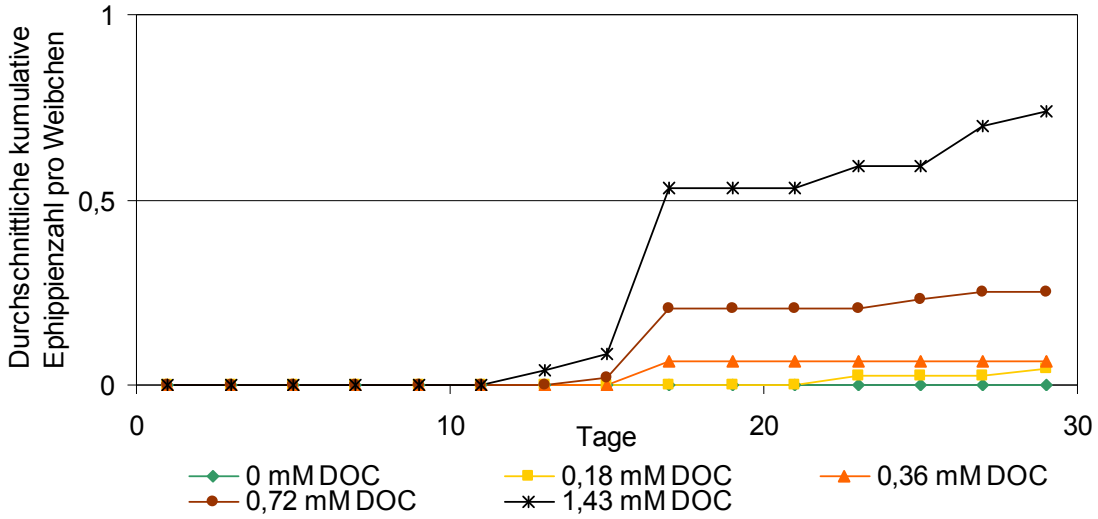

Abbildung 16: Durchschnittliche kumulative Ephippienzahl von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Parentalgeneration).

3.1.3.1.2 Erste Filialgeneration F1

3.1.3.1.2.1 Lebensspanne

Die Ergebnisse des Lebensdauertests von *D. magna* in der ersten Filialgeneration F1, die in Abbildung 17 dargestellt wurden, zeigten einen positiven Einfluss von HuminFeed® auf die Lebensspanne der Versuchstiere. Dabei zeigte die dauerhafte Exposition bei 0,72 mM DOC höchste Signifikanz ($p < 0{,}001$***; Log Rank Test).

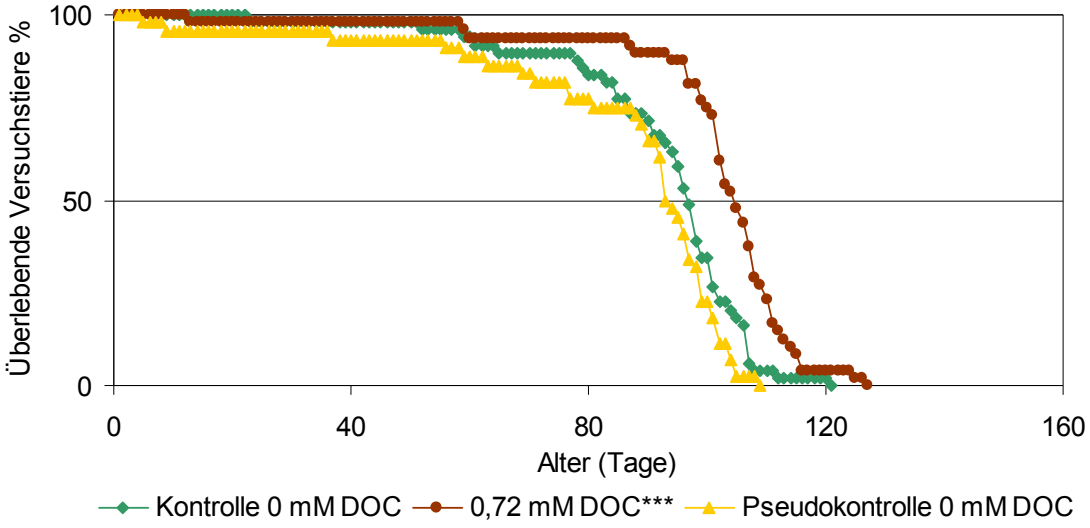

Abbildung 17: Überlebensrate von *D. magna* in der ersten Filialgeneration F1. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant.

Die Versuchstiere der Pseudokontrolle lebten kürzer als die Kontrolltiere[18]. Der Unterschied erreicht jedoch keinen signifikanten Wert (p > 0,05; Log Rank Test). Wurden die gegenüber 0,72 mM DOC exponierten Versuchstiere mit Versuchstieren der Pseudokontrolle verglichen, zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied (p < 0,001***; Log Rank Test). So lebten die exponierten Versuchstiere im Durchschnitt, im Median und im Maximal länger als die Versuchstiere der Pseudokontrolle. Eine Übersicht der untersuchten Lebensspanneparameter mit den Ergebnissen ist in der Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Lebensdauertest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Filialgeneration **F1**). Der Unterschied ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant; ns: nicht signifikant. K: Kontrolle (0 mM DOC); PK: Pseudokontrolle (0 mM DOC).

Ansätze	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit	
				Vergleich	p-Wert
Kontrolle (K)	96,7	92,7	120	K vs. DOC	< 0,001 ***
0,72 mM DOC	104,5	101,9	126	DOC vs. PK	< 0,001 ***
Pseudokontrolle (PK)	93	86,6	108	K vs. PK	= 0,06 ns

[18] Zur Erinnerung: Versuchstiere der Pseudokontrolle im Filialgenerationsversuch F1 wurden von den gegenüber 0,72 mM DOC exponierten Müttern der Parentalgeneration produziert dann wurden sie nicht mehr gegenüber HuminFeed® exponiert.

3.1.3.1.2.2 Reproduktion

HuminFeed® wirkte sich höchst signifikant negativ auf die Reproduktion von *D. magna* in der ersten Filialgeneration aus ($p < 0{,}001$***; ANOVA). So wurden weniger durchschnittliche kumulative Nachkommen pro Weibchen bei dauerhafter Exposition gegenüber 0,72 mM DOC im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abbildung 18).

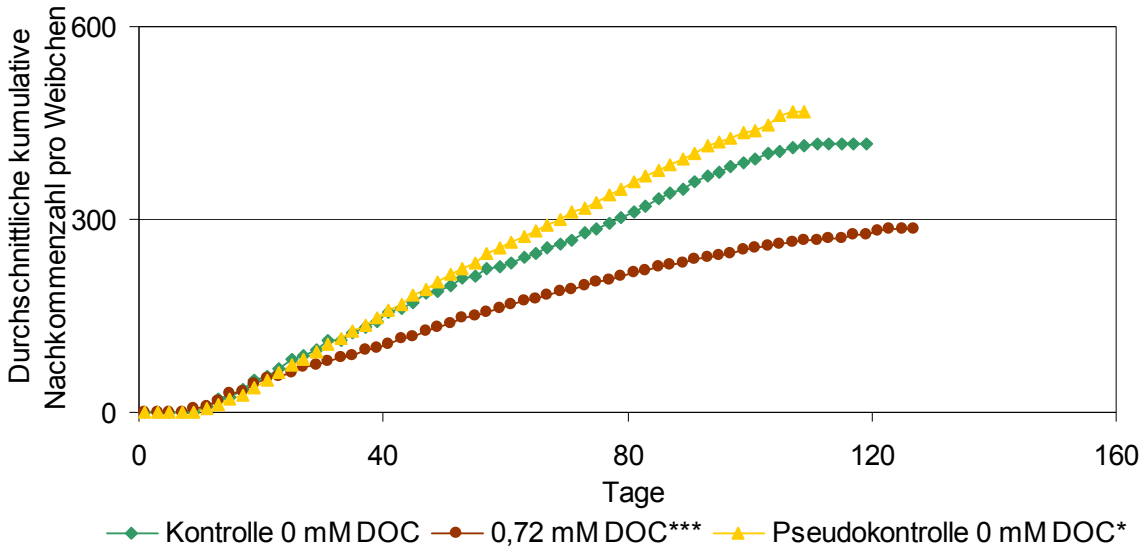

Abbildung 18: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* in der ersten Filialgeneration **F1**. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}05$*) signifikant und ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant.

Überraschend war, dass die Versuchstiere der Pseudokontrolle fruchtbarer als die Kontrollversuchstiere waren. Die um ca. 13% erhöhte durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen der Pseudokontrolle erreichte einen signifikanten Wert ($p < 0{,}05$*; T-Test). Wurden die gegenüber 0,72 mM DOC exponierten Versuchstiere mit Versuchstieren der Pseudokontrolle verglichen, zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0{,}001$***; ANOVA). So produzierte *D. magna* im Pseudokontrollansatz ca. 64% mehr Nachkommen als die exponierten Versuchstiere (Tabelle 24).

Tabelle 24: Reproduktionstest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Filialgeneration **F1**). Der Unterschied ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant. K: Kontrolle (0 mM DOC); PK: Pseudokontrolle (0 mM DOC).

Ansätze	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit	
		Vergleich	p-Wert
K	417,3	K vs. DOC	< 0,001 ***
0,72 mM DOC	285,4	DOC vs. PK	< 0,001 ***
PK	468	K vs. PK	< 0,05*

D. magna produzierte bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* in Filialgeneration F1 weder mit noch ohne HuminFeed® Ephippien.

3.1.3.1.3 Zweite Filialgeneration F2

3.1.3.1.3.1 Lebensspannen

Bei dauerhafter Exposition wirkte sich HuminFeed® weiter positiv auf die Lebensspanne vom *D. magna* in der zweiten Filialgeneration F2 aus (Abbildung 19).

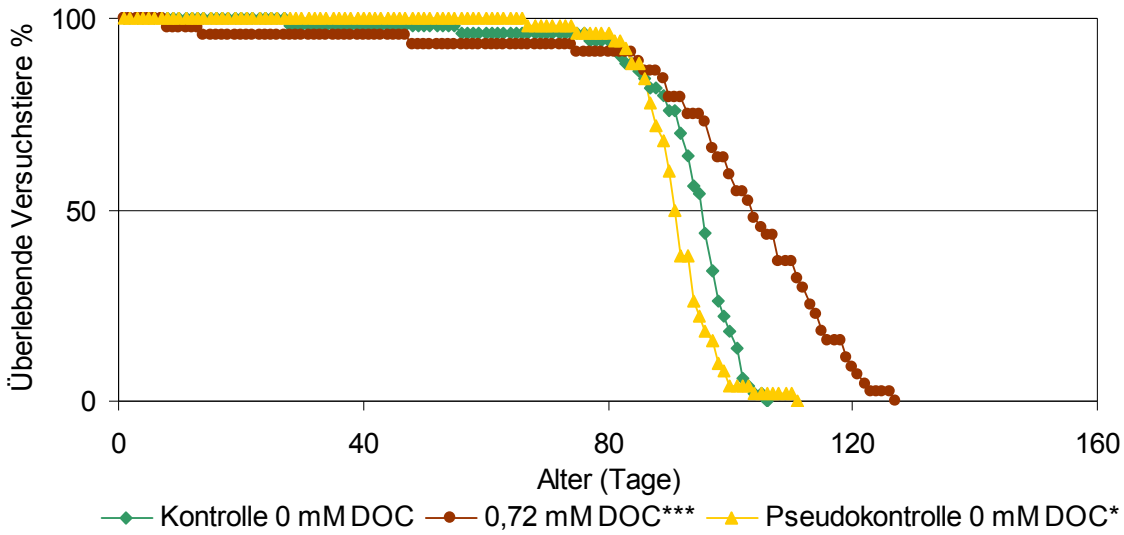

Abbildung 19: Überlebensrate von *D. magna* in der zweiten Filialgeneration **F2**. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe höchst signifikant (p < 0,001***; Log Rank Test). So lebten die exponierten Versuchstiere im Durchschnitt, im Median und im Maximal länger als die Kontrolltiere (Tabelle 25). Dagegen lebten die Versuchstiere der Pseudokontrolle im Durchschnitt und im Median signifikant kürzer als die Kontrolltiere (p < 0,05*; Log Rank Test; siehe Abbildung 19 und Tabelle 25)[19]. Wurden die gegenüber 0,72 mM DOC exponierten Versuchstiere mit Versuchstiere der Pseudokontrolle verglichen, zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied (p < 0,001***; Log Rank Test). So lebten die exponierten Versuchstiere im Durchschnitt, im Median und im Maximal länger als die Versuchstiere der Pseudokontrolle (Tabelle 25).

Tabelle 25: Lebensdauertest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Filialgeneration **F2**). Der Unterschied ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant. K: Kontrolle (0 mM DOC); PK: Pseudokontrolle (0 mM DOC).

Ansätze	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit	
				Vergleich	p-Wert
Kontrolle (K)	95,4	92,8	105	K vs. DOC	< 0,001 ***
0,72 mM DOC	103,5	99,4	126	DOC vs. PK	< 0,001 ***
Pseudokontrolle (PK)	91	91,3	110	K vs. PK	< 0,05*

3.1.3.1.3.2 Reproduktion

HuminFeed® wirkte sich höchst signifikant negativ auf die Reproduktion von *D. magna* in der zweiten Filialgeneration aus (p < 0,001***; ANOVA). So wurde eine geringere durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei dauerhafter Exposition gegenüber 0,72 mM DOC im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abbildung 20).

[19] Zur Erinnerung: Versuchstiere der Pseudokontrolle in der zweiten Filialgeneration wurden von den Versuchstieren der Pseudokontrolle des ersten Filialgenerationsversuchs F1 produziert. Das heißt: nur die Großmütter (Parentalgeneration) wurden gegenüber HuminFeed® exponiert.

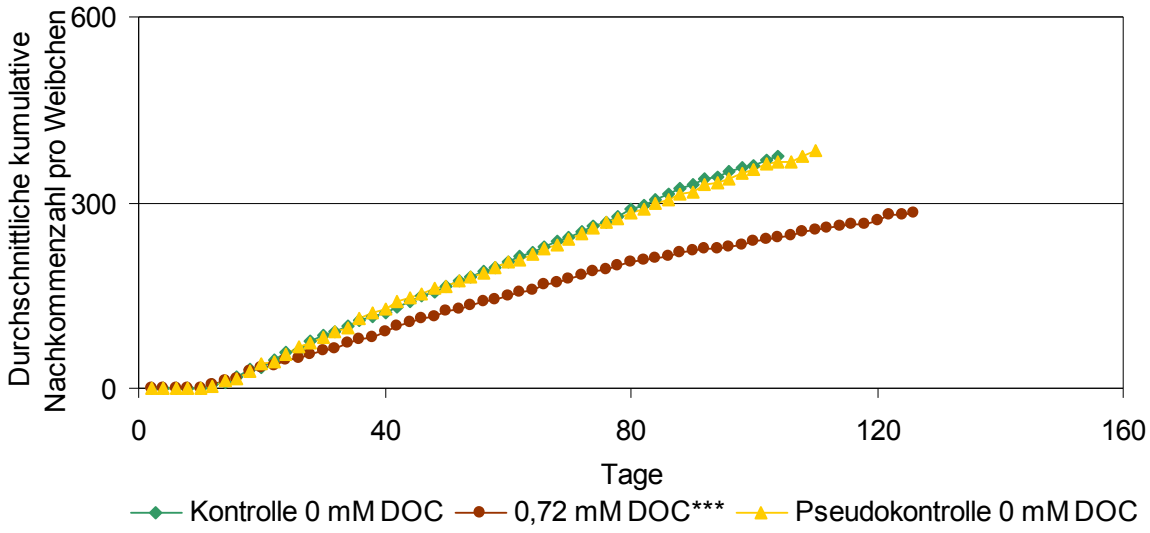

Abbildung 20: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* in der zweiten Filialgeneration **F2**. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant.

Hinsichtlich der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl unterschieden sich die Pseudokontrolle und die Kontrolle kaum voneinander (Abbildung 20 und Tabelle 26). In diesem Versuch war es jedoch auffällig, dass die Versuchstiere der Pseudokontrolle **vitaler** aussahen und **größer** waren als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). Wurden die gegenüber 0,72 mM DOC exponierten Versuchstiere mit Versuchstiere der Pseudokontrolle verglichen, zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied hinsichtlich der Reproduktionsleistung ($p < 0{,}001$***; ANOVA). So produzierte *D. magna* im Pseudokontrollansatz ca. 35% mehr Nachkommen als die exponierten Versuchstiere (Tabelle 26).

Tabelle 26: Reproduktionstest von *D. magna* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* (in Filialgeneration **F2**). Der Unterschied ist auf dem Niveau ($p < 0,01$ **) hoch signifikant und ($p < 0,001$***) höchst signifikant; ns: nicht signifikant. K: Kontrolle (0 mM DOC); PK: Pseudokontrolle (0 mM DOC).

Ansätze	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit	
		Vergleich	p-Wert
K	375,8	K vs. DOC	< 0,001 ***
0,72 mM DOC	283,3	DOC vs. PK	< 0, 01 **
PK	382,7	K vs. PK	= 0,2 ns

Weiterhin kann festgestellt werden, dass *D. magna* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* in der zweiten Filialgeneration F2 Ephippien in **Abwesenheit von Männchen** produzieren kann. So haben die Versuchstiere in allen HuminFeed®-Ansätzen Ephippien in der Zeit von der 2. bis 4. Versuchswoche produziert. Im Kontrollansatz und im Pseudokontrollansatz trat **kein** Ephippium auf. Die durchschnittliche kumulative Ephippienzahl der exponierten Versuchstiere wurde in Abbildung 21 dargestellt.

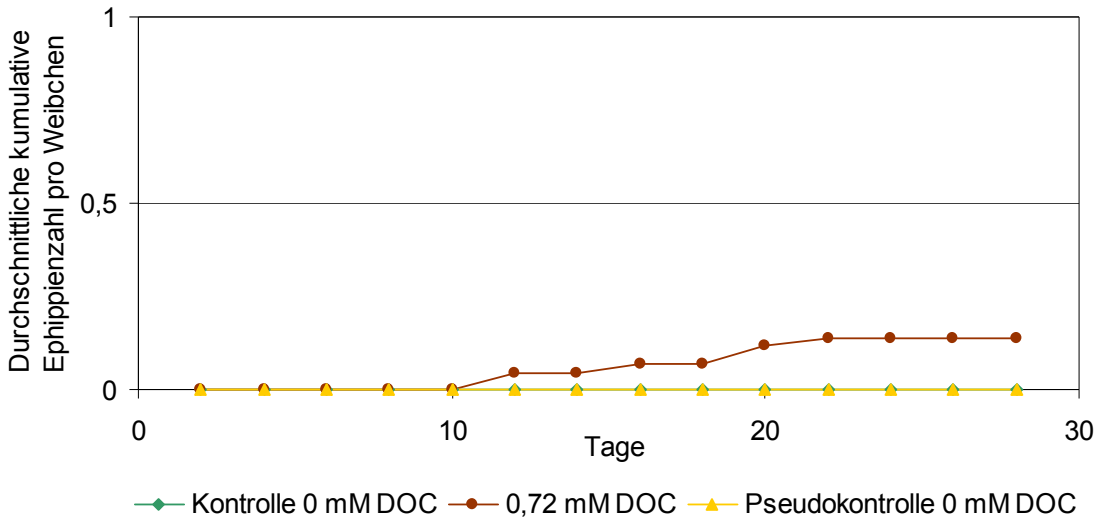

Abbildung 21: Durchschnittliche kumulative Ephippienzahl von *D. magna* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* in zweiten Filialgeneration F2

3.1.3.1.4 Vergleich der Generationen

3.1.3.1.4.1 Alter bei der Ersten Brut

Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife (11 Tage) von *D. magna* in der Parentalgeneration P wurde von HuminFeed® in einer Konzentration von 0,72 mM DOC nicht beeinflusst (Abbildung 22). Im Verlauf des Multigenerationsversuchs wurden dagegen in beiden Filialgenerationen (F1 und F2) signifikante Effekte auf die Entwicklung beobachtet. In der ersten Filialgeneration F1 ist der mittlere Schlupfzeitpunkt der Jungtiere erster Brut bei den gegenüber 0,72 mM DOC exponierten Versuchstieren hoch signifikant vorverlegt ($p < 0,01^{**}$, ANOVA). So schlüpften die Jungtiere der ersten Brut im Ansatz mit 0,72 mM DOC im Durchschnitt ca. zwei Tage früher als die Kontrolle. Die Pseudokontrollversuchstiere brauchten im Durchschnitt 10,8 Tage bis zur Reife, was keinen signifikanten Unterschied zu Kontrolle (im Durchschnitt 10,6 Tage) darstellt (Abbildung 22).

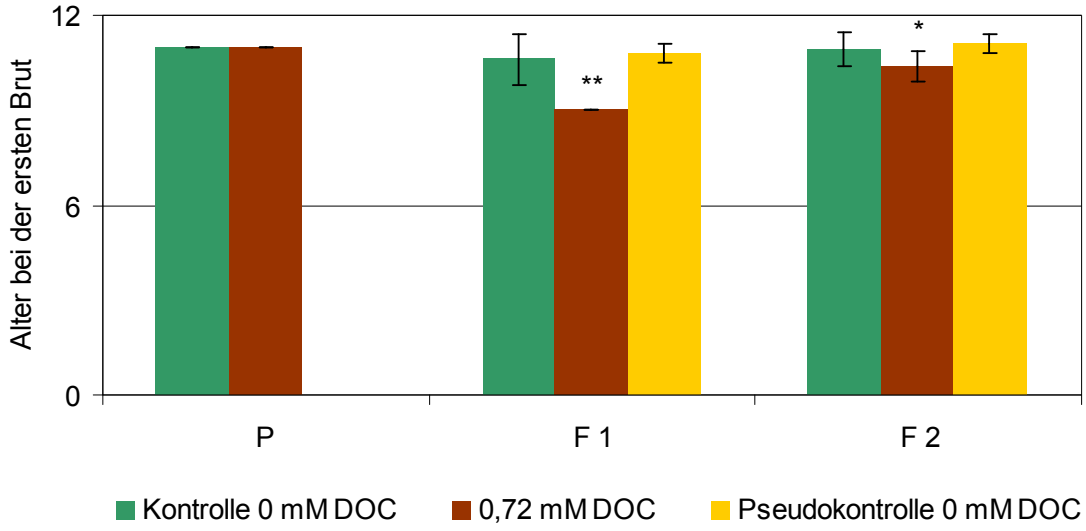

Abbildung 22: Alter der weiblichen *Daphnia magna* bei der ersten Brut in Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2). Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05^{*}$) signifikant und ($p < 0,01^{**}$) hoch signifikant. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

In der zweiten Filialgeneration F2 ist der mittlere Schlupfzeitpunkt der Jungtiere erster Brut signifikant früher als bei den mit 0,72 mM DOC exponierten Versuchstieren ($p < 0,05^{*}$, ANOVA). So betrug die Dauer der Entwicklung bis zur

Reife 10,4 Lebenstage bei den exponierten Versuchstieren. Die Pseudokontrollversuchstiere brauchten im Durchschnitt 11,1 Tage bis zur Reife, was keinen signifikanten Unterschied zu Kontrolle (10,9 Tage) darstellt

3.1.3.1.4.2 Reproduktion

Im Verlauf des Multigenerationsversuchs wurden stets höchst signifikante negative Effekte von HuminFeed® in einer Konzentration von 0,72 mM DOC auf die Reproduktion von *D. magna* in den drei Generationen (P, F1 und F2) festgestellt (Abbildung 23).

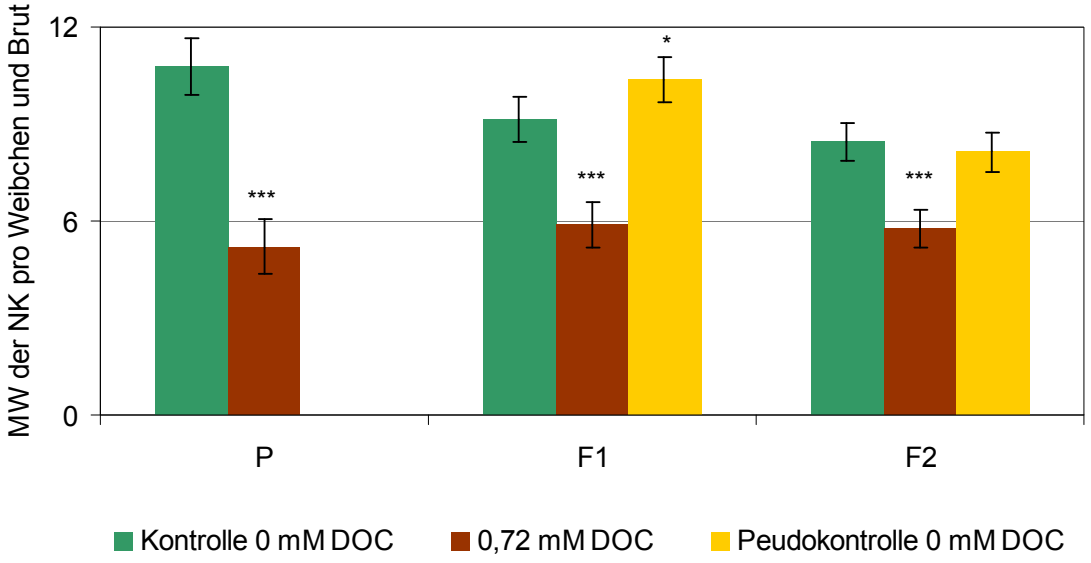

Abbildung 23: Mittelwert der Nachkommenzahl (NK) pro Weibchen und Brut von *D. magna* in Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2). Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant und ($p < 0,001$***) höchst signifikant. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

Exponierte Versuchstiere in der Parentalgeneration produzierten im Durchschnitt 5,2 **N**ach**k**ommen pro **W**eibchen und **B**rut (NK/W.B), was ca. 52% der Nachkommenzahl der Kontrolle darstellt. In erster Filialgeneration F1 produzierten exponierte Versuchstiere ebenfalls geringere Nachkommen pro Weibchen und Brut (im Durchschnitt 5,9) im Vergleich zu den Kontrollversuchstieren der F1-Generation (im Durchschnitt 9,1), was eine Verringerung um ca. 35% darstellt. Dagegen produzierten die Versuchstiere der Pseudokontrolle im Durchschnitt **mehr** Nachkommen pro Weibchen und Brut (10,4) als die Kontrollversuchstiere

(9,1). In zweiter Filialgeneration F2 produzierten exponierte Versuchstiere geringere Nachkommen pro Weibchen und Brut (im Durchschnitt 5,8) im Vergleich zu den Kontrollversuchstieren der F2-Generarion (im Durchschnitt 8,4), was eine Verringerung um ca. 31% darstellt. Der Unterschied zwischen Kontrolle (8,4 NK/W.B) und Pseudokontrolle (8,1 NK/W.B) erreichte **keinen** signifikanten Wert.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die **Kontrolltiere** der Parentalgeneration P im Durchschnitt eine höhere Nachkommenzahl als die Kontrolltiere der Filialgenerationen F1 und F2 besaßen (Abbildung 24). Die erhaltenen Ergebnisse sind hoch signifikant in der F1-Generation (p < 0,01**; T-Test) und höchst signifikant in der F2-Generation (p < 0,001***; T-Test).

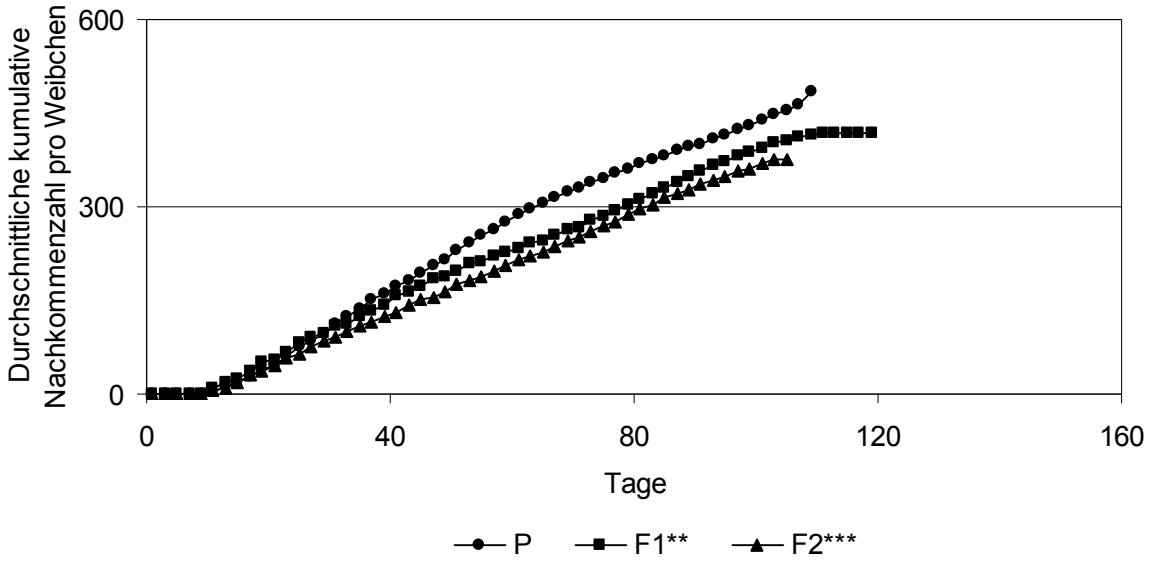

Abbildung 24: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* in **Kontrollgruppen** der Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2). Der Unterschied zur P ist auf dem Niveau (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant.

3.1.3.1.4.3 Lebensspanne

Hinsichtlich der Lebensspanne lebten die **Kontrolltiere** der Parentalgeneration P im Durchschnitt und im Median **kürzer** als die Kontrolltiere der Filialgenerationen F1 und F2 (Abbildung 25). Die erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nur in F2 signifikant (p < 0,05*; Log Rank Test).

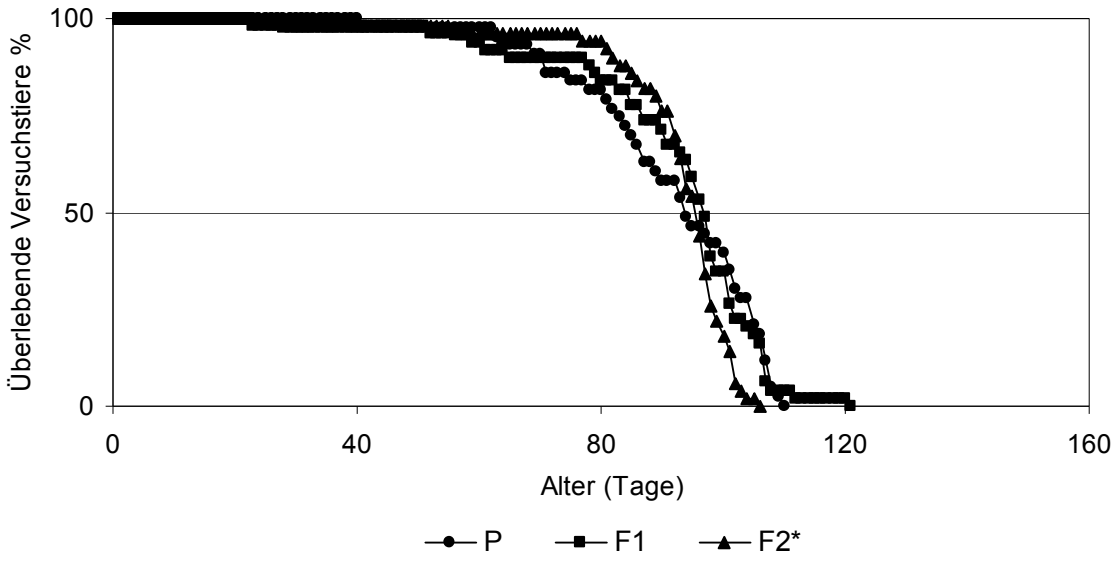

Abbildung 25: Überlebensrate von *D. magna* in **Kontrollgruppen** der Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2). Der Unterschied zur P ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant.

Eine Übersicht der untersuchten Lebensspanneparameter von Kontrollgruppen über drei Generationen mit den Ergebnissen ist in der Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Lebensdauertest in der Kontrollgruppen von *D. magna* über drei Generation. Der Unterschied zur Parentalgeneration P ist auf dem Niveau (p < 0,05*) in Filialgeneration F2 signifikant; ns: nicht signifikant.

Exponierte Generation	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit	
				Vergleich	p-Wert
P	93,7	91,7	109	P vs. F1	= 0,9 ns
F1	96,7	92,7	120	F1 vs. F2	< 0,05*
F2	95,4	92,8	105	P vs. F2	< 0,05*

In diesem Multigenerationsversuch war es auffällig, dass sich die Quantität (Zahl pro Weibchen und Brut) und die Qualität (Große, Form und Schwimmgeschwindigkeit) der Nachkommen der Versuchstiere (mit oder ohne HuminFeed®) in den letzten Versuchstagen verschlechtert haben.

3.1.3.1.5 Effekte der dauerhaften Exposition gegenüber HuminFeed®

3.1.3.1.5.1 Lebensspanne

Bei der Betrachtung der Lebensspanne von *D. magna* über drei Generationen unter dauerhafter Exposition gegenüber HuminFeed® in einer Konzentration von 0,72 mM DOC wurde festgestellt, dass die exponierten Versuchstiere in den Filialgenerationen F1 und F2 kürzer lebten als exponierte Versuchstiere in der Parentalgeneration P (Abbildung 26). Die erhaltenen Ergebnisse sind in F1 stärker ausgeprägt als in F2.

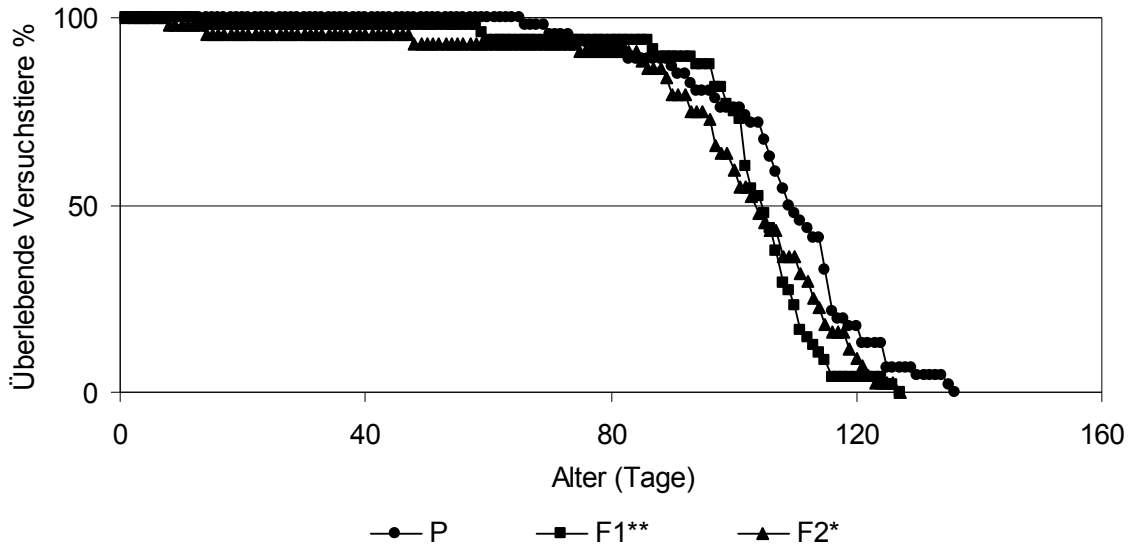

Abbildung 26: Überlebensrate von *D. magna* in **exponierten** Ansätzen der Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2). Der Unterschied zur P ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant und ($p < 0,01$**) hoch signifikant.

So lebten (im Durchschnitt, Median und Maximal) die exponierten Versuchstiere der Filialgeneration F1 hoch signifikant ($p < 0,01$**; Log Rank Test) und der F2 signifikant ($p < 0,05$*; Log Rank Test) kürzer als die exponierten Versuchstiere der Parentalgeneration P (Tabelle 28). Der Unterschied zwischen F1 und F2 erreichte keinen signifikanten Wert ($p > 0,05$; Log Rank Test).

Tabelle 28: Lebensdauertest der gegeüber 0,72 mM DOC exponierten *D. magna* über drei Generation. Der Unterschied zur Parentalgeneration P ist auf dem Niveau (p < 0,05*) in Filialgeneration F1 signifikant und (p < 0,01**) in Filialgeneration F2 hoch signifikant; ns: nicht signifikant.

Exponierte Generation	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit	
				Vergleich	p-Wert
P	109	107,6	135	P vs. F1	< 0, 01 **
F1	104,5	101,9	126	F1 vs. F2	= 0,55 ns
F2	103,5	99,4	126	P vs. F2	< 0,05*

3.1.3.1.5.2 Reproduktion

Die gegenüber 0,72 mM DOC **exponierten** Versuchstiere der Parentalgeneration P produzierten eine **geringere** durchschnittliche **N**ach**k**ommenzahl (280 NK) als die exponierten Versuchstiere der Filialgenerationen F1 (ca. 286 NK) und F2 (ca. 284 NK) (Abbildung 27). Die erhaltenen Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant (p > 0,05; ANOVA).

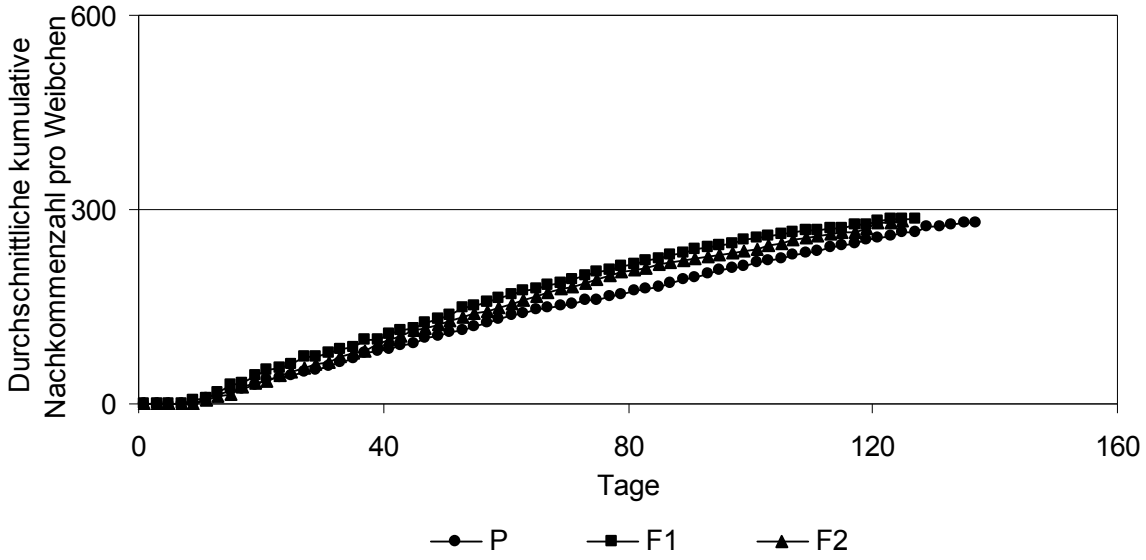

Abbildung 27: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* in **exponierten** Ansätzen der Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2). Der Unterschied zur P ist nicht signifikant.

Bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* produzierte *D. magna*, die gegenüber einer Konzentration von 0,72 mM DOC HuminFeed® exponiert wurde, in der Parentalgeneration und in der zweiten Filialgeneration F2 Ephippien. Die

durchschnittliche kumulative Ephippienzahl ist allerdings in P **hoher** als in F2. In der ersten Filialgeneration F1 trat **kein** Ephippium auf (Abbildung 28).

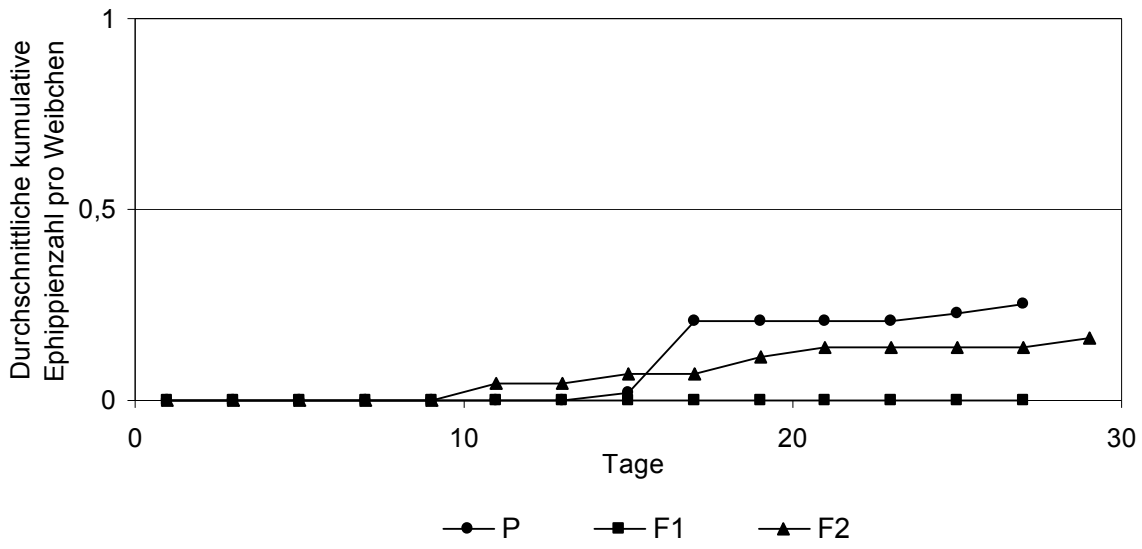

Abbildung 28: Durchschnittliche kumulative Ephippienzahl von *D. magna* in **exponierten** Ansätzen der Parentalgeneration (P) und Filialgenerationen (F1, F2).

3.1.3.2 Diskussion

Bedingt durch die Anwesenheit von Huminstoffen in fast allen Gewässern, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen (Steinberg 2003), sind die darin lebenden Organismen **permanent** den Huminstoffen ausgesetzt. Die Multigenerationsstudie ist die Methode der Wahl um generationsübergreifende Effekte von Substanzen analysieren und bewerten zu können. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen Multigenerationsversuch durchgeführt, um die Effekte der Huminstoffe, am Beispiel des Präparates **HuminFeed®**, auf Lebensparameter (Lebensspanne und Reproduktion) von ***D. magna* über drei Generationen** zu ermitteln.

Ergebnisse des durchgeführten Multigenerationsversuchs zeigten, dass die Wirkungsweise in den drei Generationen identisch war. So wirkte sich HuminFeed® stets höchst signifikant **positiv auf Lebensspanne** und höchst signifikant **negativ auf Reproduktion** von *D. magna* aus. Dies konnte daher die Annahme der „**Disposable Soma Theorie**“ sowohl in der Parentalgeneration als auch in den Filialgenerationen bestätigen. In welcher Weise weitere

Filialgenerationen (F3, F4, F5…) beeinflusst würden, bleibt jedoch fraglich. Bei Beendigung des Multigenrationsversuchs nach der dritten Generation, wären die Huminstoffeffekte vermutlich unterschätzt worden, da man von einer vollständigen **Akklimatisierung** an die Substanzen ausgegangen wäre. Dementsprechend lassen sich die Effekte der Huminstoffe erst durch eine mehrere Generationen umfassende Studie genauer einschätzen.

Überraschenderweise wurde im Filialgenerationsversuch F1 festgestellt, dass die Versuchstiere der Pseudokontrolle **fruchtbarer** waren als die Kontrolltiere. So haben die Versuchstiere der Pseudokontrolle eine höhere kumulative Nachkommenzahl als die Kontrolltiere produziert (Abbildung 18). Dieser Unterschied war sogar statistisch signifikant. Das Auftreten hormonähnlicher Effekte der Huminstoffe (Steinberg et al. 2004) sind unwahrscheinlich, da die Pseudokontrollversuchstiere nur im Embryonenstadium, als sie noch im Brutraum der exponierten Parentalversuchstiere waren, HuminFeed® ausgesetzt waren.

Eine potentielle Erklärung für die erhöhte Nachkommenzahl in der Pseudokontrolle könnte in **Transgenerationseffekten** vom HuminFeed® (parentale Weitergabe in die folgende Generation) durch epigenetische Programmierung liegen[20].

Auf der phänomenologischen Ebene wurden bei *D. magna* Transgenerationseffekte durch Stress aufgrund der Futterqualität beschrieben (Frost et al. 2010). So wirkte sich die Phosphor-arme Alge bei Müttern (Parentalgeneration) auf das Wachstum und die Reproduktion der Nachkommen (Filialgeneration) aus. Wenn diese Nachkommen der gestressten Mütter mit einer Phosphor-reichen Alge gefüttert wurden, reproduzierten sie sich ähnlich und wuchsen aber schneller als die Nachkommen der mit P-reiche Alge gefütterten Mütter. Frost et al. (2010) konnten jedoch keine epigenetische Programmierung bei *D. magna* nachweisen.

[20] Erklärung der epigenetischen Programmierung siehe Einleitung

Es gibt bisher Allerdings nur wenige Veröffentlichungen, die über mögliche epigenetische Regulation der Genexpression in *D. magna* berichten. So wurde dieser Aspekt bei *D. magna* von Vandegehuchte et al. (2009, 2010) bearbeitet. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass (1) DNA-Methylierung auch in *D. magna* auftritt (Vandegehuchte et al. 2009) und (2) durch eine von mehreren getesteten organischen Chemikalien, nämlich 5-Azacytidin (Vandegehuchte et al. 2010) moduliert wird. Durch 5-Azacytidin kam es zu einer Demethylierung der DNA, die sich in die Filialgeneration F1 fortsetzte. Die epigenetische Genregulation war jedoch in F2 **nicht nachhaltig**.

Potgeter (1998) konnte In seiner Dissertation zeigen, dass Huminstoffe spontane Abgeber von Methylgruppen sind. Daher ist es denkbar, dass Huminstoffe die DNA-Methylierung in der exponierten Parentalgenration vermittelten und Transgenerationseffekte in der Filialgeneration F1, aber nicht in F2, induzieren konnten. Die DNA-Methylierung könnte vermutlich zur Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene, die für Förderung der Reproduktion bzw. d Lebensspanne verantwortlich sind, führen.

Die Ergebnisse der potentiellen Transgenerationseffekte der Huminstoffe, gemessen an einer signifikanten erhöhten Reproduktionsleistung der Pseudokontrolle in F1, konnten hier nicht durch die Analyse der DNA-Methylierung verifiziert werden. Es lässt sich in weiteren Studien untersuchen.

Weiterhin haben die Ergebnisse aufgezeigt, dass das Medium in der die exponierte Parentalgeneration aufgewachsen ist, die Fruchtbarkeit der **Filialgeneration F2 nicht nachhaltig** beeinflusst. Der Reproduktion fördernde Transgenerationsffekt nivelliert sich hin zur zweiten Filialgeneration F2 (Abbildung 20).

Zusammenfassend könnte interpretiert werden, dass die tatsächlich erhöhte Nachkommenzahl in der Pseudokontrolle der ersten Filialgeneration F1 entweder aufgrund **epigentischer Vererbung** oder durch transportierte **mütterliche Signale**, die die Reproduktionsleistung steuern könnten, nicht an Filialgeneration F2 weitergegeben werden konnte.

Darüber hinaus beeinflusste HuminFeed® die Reproduktionsmode der Versuchstiere in der Parentalgeneration. So haben einige exponierte Versuchstiere, interessanterweise in **Abwesenheit von Männchen,** Ephippien produziert (Abbildung 16). In der Literatur ist ebenfalls berichtet, dass während der Phase der Ephippien-Produktion in einer Daphnien-Population nur ein geringer Anteil der Daphnien Ephippien produziert, während die meisten Daphnien Neonaten produzieren (Spaak 1995). Normaleweise sind Ephippien Stressindikatoren (für Details siehe Einleitung). Sie sind eigentlich ein wichtiger Teil der Lebensstrategie, die es der Population ermöglichen, ungünstige Umweltbedingungen zu überstehen (siehe z. B. Lampert & Sommer 2007). Daher ist die Produktion der Ephippien in *D. magna* eine Auswahl der Resistenz. Nur wenige Arten von *Daphnia* sind in der Lage, Ephippien ohne Männchen zu produzieren (Hebert 1981; Hebert et al. 1989; Spaak 1995). In diesem Fall sind die Ephippien wahrscheinlich leer (Spaak 1995). Ob die hier produzierten Ephippien leer oder schlüpffähig sind, bleibt jedoch ungeklärt. In der Filialgeneration F1 kam es wahrscheinlich zu einer **Akklimatisierung** an den Huminstoff, so dass die Versuchstiere **keine** Ephippien mehr produzierten. Erst in der zweiten Filialgenerationen **traten erneut** Huminstoffeffekte in Bezug auf die Reproduktionsmode bei den Daphnien auf (Abbildung 28). So produzierten die exponierten Versuchstiere der F2-Generation Ephippien (auch in Abwesenheit von Männchen). Da sich HuminFeed® auf die Reproduktionsmode **nicht kontinuierlich** auswirkte, verdeutlichen diese Ergebnisse die Notwendigkeit eine Ausweitung der Expositionsdauer über mehrere Filialgenerationen, denn die Effekte von Huminstoffen auf den untersuchten Parameter könnten hier über nur drei Generationen unter- oder überschätzt werden. Darüber hinaus liegt die Vermutung nahe, dass aquatische Organismen wahrscheinlich aufgrund zu hoher Fitnesskosten **keine dauerhafte Resistenz** gegenüber den in die Gewässer eingetragenen Huminstoffen entwickeln können.

Des Weiteren deuten die Ergebnisse des Multigenerationsversuchs darauf hin, dass *D. magna* relativ schnell in der Lage ist, sich an biotische und abiotische Umweltbedingungen zu akklimatisieren. Dies kann über eine Erhöhung der Reproduktionsleistung oder über eine Verlängerung der Lebensspanne bzw. Ephippien-Produktion geschehen. Dieses kann als Stress-Reaktion gesehen

werden, um das Risiko für die exponierte Population zu minimieren. Die Geschwindigkeit der Stress-Reaktion wird dabei entscheidend von der Intensität des Stressors bestimmt.

So liegt ein interessanter Zusammenhang in der Tatsache, dass bei dauerhafter Exposition gegenüber HuminFeed® in einer Konzentration von 0,72 mM DOC über drei Generation die Versuchstiere der Filialgenerationen F1 und F2 signifikant bzw. hoch **signifikant kürzer** lebten aber **tendenziell mehr** Nachkommen produzierten als die Versuchstiere der Parentalgeneration (Abbildungen 26, 27). Außerdem verkürzte sich deutlich die Dauer der Entwicklung bis zur Reife der Daphnien in den Filialgenerationen F1 und F2 durch die dauerhafte Exposition gegenüber 0,72 mM DOC im Vergleich zur Parentalgeneration. Dieses Resultat verdeutlicht die Bedeutung der Reproduktion für den möglichen **Erfolg der Population** und könnte darauf hindeuten, dass die vorhandenen Ressourcen zwischen den drei Fitnessparametern (Lebensspanne, Reproduktion und Alter) bei der Reife **verteilt** würden (Lampert et al. 1994). Zum Teil wurden vergleichbare Ergebnisse von Sánchez et al. (2004) in einer Multigenerationsstudie mit *D. magna* aufgezeigt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Versuchstiere der ersten Filialgeneration eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Molinate entwickelten: Sie reproduzierten sich mehr und lebten länger als die Daphnien der Parentalgeneration. Sánchez et al (2004) gingen somit von einer Adaption an Molinate aus. In einem anderen Multigenerationsversuch mit *D. magna* wurde jedoch nachgewiesen, dass die exponierten Versuchstiere der Filialgeneration sensitiver gegenüber dem Insektizid Diazinon als die Parentalgenration reagierten (Sánchez et al. 2000). So produzieren die exponierten Versuchstiere der Filialgeneration weniger Nachkommen und lebten kürzer als die exponierte Parentalgenration. Sánchez et al. (2000) vermuteten, dass das Insektizid Diazinon im Körper der Versuchstiere der Parentalgeneration akkumulierte und dann in die Filialgeneration transferiert wurde. So waren die Effekte dieses Insektizids sowohl auf die Reproduktion als auch auf die Lebensspanne bei der Filialgeneration größer als bei der Parentalgeneration. Im Multigenerationsversuch der vorliegenden Arbeit wurden nicht alle Lebensparameter gleich (positiv oder negativ) von HuminFeed® beeinflusst. Dies ermöglicht es, die „**Disposable Soma**

Theorie“ nicht nur im Lauf einer Generation sondern auch über mehreren Generationen anzunehmen.

Bei der Betrachtung aller Kontrollgruppen über drei Generationen, die mit der suboptimalen Futteralge *D. armatus* gefüttert wurden, zeigten sich deutlich andere Zusammenhänge einzelner Lebensparameter. So wurde in den Filialgenerationen **Lebensverlängerung,** teilweise signifikant, **auf Kosten** der hoch signifikanten bzw. höchst signifikanten **Verringerung der Reproduktionsleistung** im Vergleich zur Parentalgenration festgestellt (Abbildungen 24, 25). Dies ließ ein gewisses Maß an **Akklimatisierung** der Filialgenerationen vermuten. Kaneko et al. (2011) zeigten in einer Studie mit der Rotifere *Branchionus plicatilis* eine ähnlich Korrelation bei dauerhaftem Nahrungsmangel (Calorie Restriction, über zwei Generationen) auf. Dabei lebte *B. plicatilis* in der Filialgeneration bei einem Fütterungsregime „Calorie Restriction“ länger als ihre Parentalgeneration, die ebenfalls bei diesem Fütterungsregime gehalten wurde.

Daher ist anzunehmen, dass die Strategie von *D. magna* bei verschiedenen Stressfaktoren **über mehrere Generationen** unterschiedlich ist. Bei dauerhaftem Stress ausgelöst durch die **suboptimale Futteralge** *D. armatus*, lebten die Versuchstiere der Filialgenerationen länger als die Versuchstiere der Parentalgeneration aber produzierten weniger Nachkommen. Im Gegensatz dazu lebten die Versuchstiere der Filialgenerationen kürzer als die Versuchstiere der Parentalgeneration produzierten jedoch mehr Nachkommen bei dauerhaftem **chemischen Stress** ausgelöst durch HuminFeed®. Wahrscheinlich ist die Strategie von *D. magna* bei dauerhaftem Stress ausgelöst durch die suboptimale Futteralge **sinnvoller**, da sie sich bis zum Tod reproduzieren kann. Dies könnte die Chance der Population ermöglichen, ungünstige Fütterbedingungen zu überstehen. Dementsprechend wäre anzunehmen, dass die Futterqualität größere Effekte auf *D. magna* bzw. auf die Etablierung ihrer Population in einem Gewässer erzielen würde als Huminstoffe. Es lässt sich jedoch in weiteren Studien klären, wie weit sich die Effekte der Futterqualität gegen andere auf *D. magna* wirkenden Umweltfaktoren (z. B. Prädation, Parasiten usw.) durchsetzen würden.

3.2 *Daphnia galeata*

Da *D. galeata* sensitiv auf Schadstoffe reagieren kann, wurde sie bereits bei unterschiedlichen Tests eingesetzt. Jedoch existieren bislang **keine** Studien zum Einfluss von Huminstoffen auf *D. galeata*. Daher wurden in dieser Arbeit Langzeitexperimente durchgeführt, bei denen die Auswirkungen des Huminstoffpräparates HuminFeed® auf die Reproduktion und auf die Lebensspanne von *D. galeata* getestet wurden. Dabei wurde versucht, die Effekte verschiedener Futteralgenqualitäten zu überprüfen.

3.2.1 *Daphnia galeata* auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.2.1.1 Ergebnisse

3.2.1.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* wirkte sich HuminFeed® in allen getesteten Konzentrationen positiv auf die Lebensspanne von *D. galeata* aus (Abbildung 29).

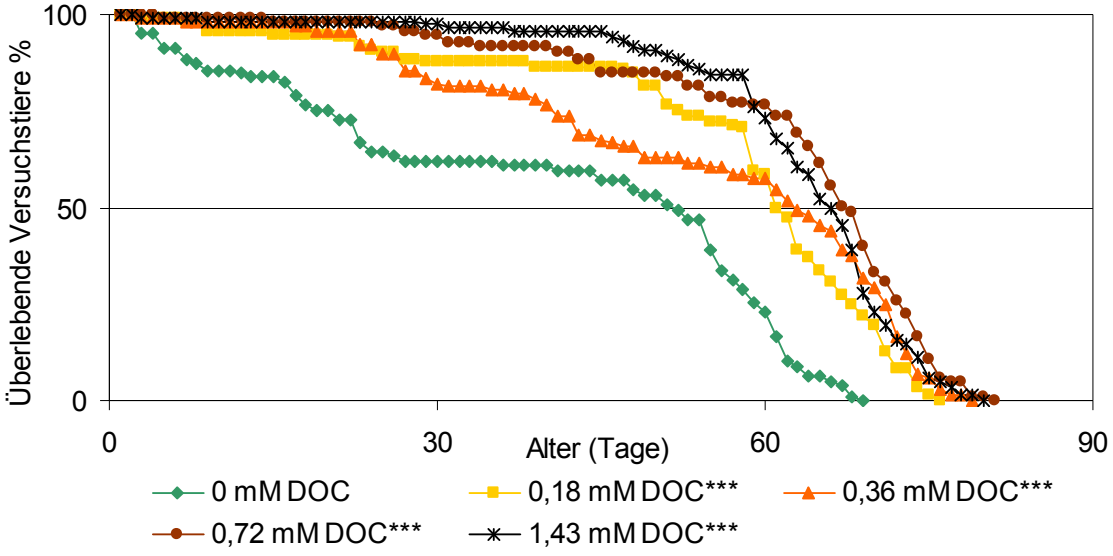

Abbildung 29: Überlebensrate von *D. galeata* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe höchst signifikant in allen Ansätzen (p < 0,001***; Log Rank Test). Im Durchschnitt zeigten die Versuchstiere des Kontrollansatzes die geringste Lebensspanne mit nur 40 Tagen. Im Ansatz mit 1,43 mM DOC wurden die Tiere im Durchschnitt mit 63,4 Tagen (ca. 59% Erhöhung) am ältesten. Die höchste mediane Lebensspanne von *D. galeata* wurde mit 67 Tagen (ca. 31% Erhöhung) im Ansatz mit 0,72 mM DOC festgestellt. Im Kontrollansatz konnten 50% der Versuchstiere nur 51,5 Tage überleben. Die Kontrollgruppe wies die kleinste maximale Lebensdauer mit nur 68 Tagen auf. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 50% der Versuchstiere in Ansätzen mit 0,72 oder 1,43 mM DOC noch am Leben. Weitere statistische Ergebnisse zu diesem Versuchsansatz enthält Tabelle 28.

Tabelle 28: Lebensdauertest von *D. galeata* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	51,5	100	40	100	68	100	
0,18	61	118,3	56,3	140,6	75	110,3	< 0,001 ***
0,36	6267	121,6	54,6	136,4	78	114,7	< 0,001 ***
0,72	67,2	130,2	62,8	157	80	117,6	< 0,001 ***
1,43	65,9	128	63,4	158,3	79	116,2	< 0,001 ***

3.2.1.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 8-9 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *D. galeata* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. HuminFeed® wirkte sich in allen getesteten Konzentrationen negativ auf die Reproduktion von *D. galeata* aus (Abbildung 30).

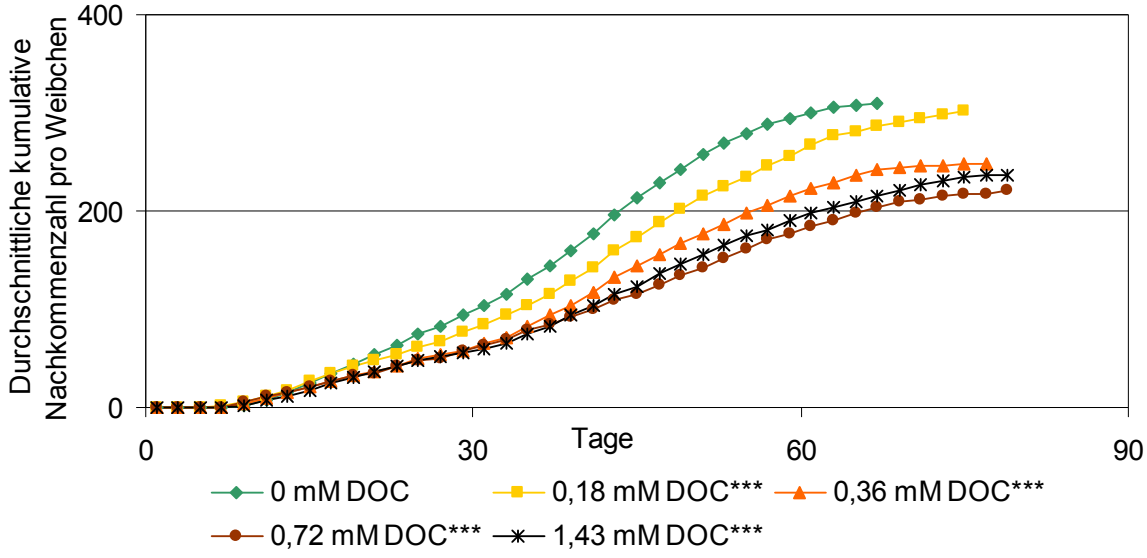

Abbildung 30: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. galeata* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant; ($p < 0,01$**) hoch signifikant und ($p < 0,001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe im Ansatz mit 0,18 mM DOC signifikant ($p < 0,05$*; ANOVA); im Ansatz mit 0,36 mM DOC hoch signifikant ($p < 0,01$**; ANOVA) und in den Ansätzen mit 0,72 und 1,43 mM DOC höchst signifikant ($p < 0,001$***; ANOVA). Allerdings war bis zum 21. Versuchstag (ca. ein Viertel der Lebensspanne von *D. galeata*) keine deutliche Veränderung der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl pro Weibchen zu erkennen. Die Versuchstiere im Kontrollansatz haben im Durchschnitt die höchste Nachkommenzahl mit 309,8 Tieren produziert. Die geringste durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen wurde mit 220,8 Nachkommen im Ansatz mit 0,72 mM DOC festgestellt, was eine Verringerung um ca. 41% darstellt. In den anderen Ansätzen lag die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen zwischen diesen Werten (Tabelle 29).

Tabelle 29: Reproduktionstest von *D. galeata* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant; (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant. Alle Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchsansätzen.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	309,8	
0,18	301,2	< 0,05*
0,36	248,1	< 0,01**
0,72	220,8	< 0,001***
1,43	235,7	< 0,001***

Der Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut, der in Abbildung 31 dargestellt wurde, ist ebenfalls von HuminFeed® im Ansatz mit 0,18 mM DOC signifikant (p < 0,05*; ANOVA); im Ansatz mit 0,36 mM DOC hoch signifikant (p < 0,01**; ANOVA) und in Ansätzen mit 0,72 und 1,43 mM DOC höchst signifikant (p < 0,001***; ANOVA) beeinflusst worden. Es lässt sich aber keine Abnahme der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut mit zunehmender Konzentration von HuminFeed® feststellen. Es konnte jedoch keine signifikante Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen festgestellt werden (Pearson-Korrelation, R= -0,76; p = 0,24). So produzierte *D. galeata* im Kontrollansatz durchschnittlich ca. 13 Nachkommen pro Brut, während bei der zweithöchsten Huminstoff-Konzentration (0,72 mM DOC) mit 6,6 Nachkommen nur die Hälfte der Kontrollnachkommenzahl produziert wurde. Eine höhere **N**ach**k**ommenzahl wurde im Ansatz mit 1,43 mM DOC (7,4 NK), im Ansatz mit 0,36 mM DOC (8,4 NK) und im Ansatz mit 0,18 mM DOC (9,8 NK) gefunden.

Die gegenüber HuminFeed® exponierten Versuchstiere sahen **vitaler** aus und waren **dunkler,** aber **kleiner** als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden).

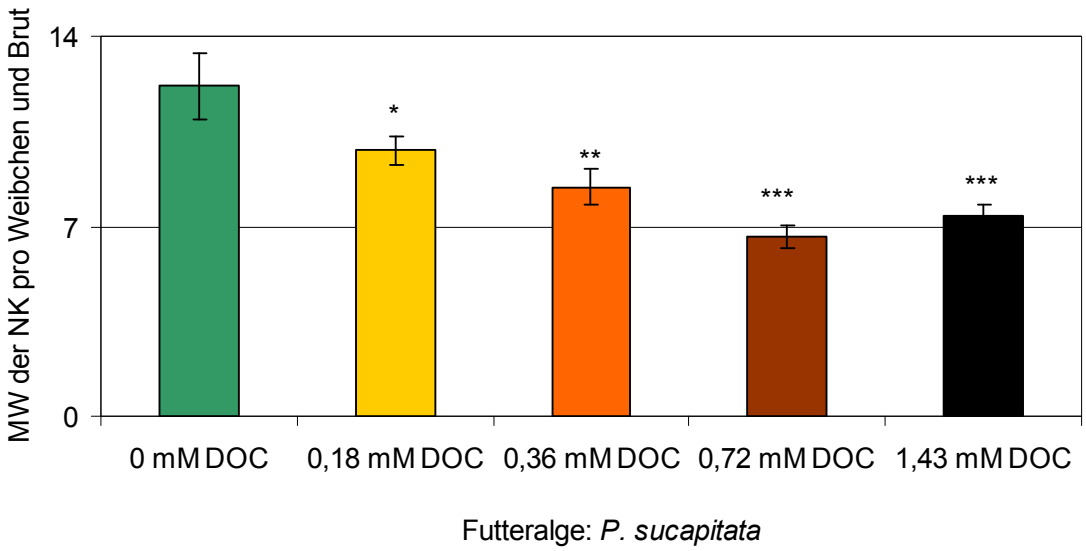

Abbildung 31: Mittelwert der Nachkommenzahl (NK) pro Weibchen und Brut von *D. galeata* bei verschiedenen HuminFeed®- Konzentrationen. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant; ($p < 0,01$**) hoch signifikant und ($p < 0,001$***) höchst signifikant. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

3.2.1.2 Diskussion

Bei Fütterung mit *P. subcapitata* hat HuminFeed® einen positiven Effekt auf die Lebensspanne von *D. galeata* erzielt. Dieser Effekt war in allen Ansätzen höchst signifikant (Abbildung 29, Tabelle 28). Im Reproduktionstest ist dagegen ein negativer Effekt vom HuminFeed® festgestellt worden (Abbildungen 30 und 31). Die erhaltenen Ergebnisse waren im Verhältnis zur Kontrollgruppe im Ansatz mit 0,18 mM DOC signifikant; im Ansatz mit 0,36 mM DOC hoch signifikant und in Ansätzen mit 0,72 und 1,43 höchst signifikant (Tabelle 29). Die Versuchstiere waren in Ansätzen mit HuminFeed® etwas kleiner als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). So zeigte sich eine reziprok-proportionale Abhängigkeit der Lebensspanne bzw. des somatischen Wachstums von der Reproduktion in den Ansätzen, denen HuminFeed® zugesetzt wurde. Die hier erhaltenen Ergebnisse können daher die Annahme der „**Disposable Soma Theorie**“ bestätigen.

3.2.2 *Daphnia galeata* auf *Monoraphidium minutum*

3.2.2.1 Ergebnisse

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 8-9 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *D. galeata* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. Die zwei parallel verlaufenden Versuche von *D. galeata* bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* liefen normal ca. 11 Tage (eigentlich bis zur zweiten Brut), dann waren die Versuchstiere sehr hell, nicht mehr vital und wiesen zum großen Teil Deformationen auf, so dass kaum neue Bruten möglich waren (in allen Ansätzen mit und ohne HuminFeed®). Viele Eier, die produziert wurden, gelangten durch den offenen Brutraum ins Wasser und konnten deshalb nicht zur Reife gelangen. Unter dem Mikroskop zeigten sich hellgelbe bzw. orange Pigmente (vermutlich Parasiten) im Brutraum der Muttertiere und im Darm der Nachkommen. Viele junge Tiere im Brutraum eines Muttertieres sind von Parasiten befallen worden. Jedoch fanden sich auch einzelne Versuchstiere, welche neben befallenen Embryonen noch ,,Gesunde" beherbergten, an denen keine sichtbare Veränderungen zu beobachten waren. Um eventuellen Infektionen durch die Medien (ADaM und FW04)[21], die Stammlösung vom HuminFeed® oder die Futteralge *M. minutum* auszuschließen, wurden alle Mediengefäße mit Salzsäure gereinigt und die Medien sowie die Stammlösung vom HuminFeed® erneut hergestellt und die Futteralge *M. minutum* erneut angesetzt, dann in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und als Futter verwendet. Der schlechte Zustand der Versuchtiere aber blieb erhalten. Darüber hinaus ist die Zeit zwischen zwei möglichen Bruten verzögert worden. Da hier keine eindeutigen Aussagen der Effekte sowohl der Futteralgenqualität als auch vom HuminFeed® zu treffen sind, wurden die beiden Versuche nach zwei Wochen abgebrochen, so dass leider keine endgültigen Ergebnisse der Versuche von *D. galeata* mit *M. minutum* erzielt werden konnten. Auch war es nicht möglich, gegen Ende der bereits geplanten Zeit für die experimentellen Arbeiten einen neuen Versuch durchzuführen. Außerdem befand sich die Stammkultur der *D. galeata* ebenfalls in einem schlechten Zustand durch „potentiellen“ Parasitenbefall.

[21] Für Namen der Medien siehe den Abschnitt: Material und Methoden

3.2.2.2 Diskussion

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* **sank die Reproduktionsrate** von *D. galeata* nach ca. 11 Tagen plötzlich ab (genau bei der zweiten Brut) und die Versuchstiere sahen **nicht mehr vital** aus. Es ist denkbar, dass ein **Parasitenbefall** als Ursache für den schlechten Zustand der Versuchstiere betrachten werden könnte. Wie es zur Infektion der Versuchstiere kommen konnte, bleibt unklar. Parasiten können einen starken Einfluss auf die Fitness der Daphnien haben, indem sie deren Fruchtbarkeit und Überleben reduzieren (z. B Bittner 1998). So sind hier **keine eindeutigen Aussagen** der „reinen" Effekte sowohl von der Futteralgenqualität als auch vom HuminFeed® auf *D. galeata* zu treffen.

3.2.3 *Daphnia galeata* auf *Desmodesmus armatus*

Da *D. galeata* in mehreren Vorkulturen die Alge *D. armatus* nicht fressen bzw. verdauen konnte, war es leider nicht möglich, einen Versuch von *D. galeata* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* durchzuführen. Allerdings soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass in wenigen Fällen mehrerer Vorkulturen die **adulten** Wasserflöhe der Art *D. galeata* die Alge *D. armatus* fressen konnten und **wenige Nachkommen** (ca. 2 NK/Weibchen und Brut) reproduzierten. Die **neugeborenen** Nachkommen (1. Generation) sind nach wenigen (maximal 4) Tagen bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* gestorben. Dabei wurde keine Reproduktion der nächsten Generation beobachtet. Damit waren die Versuchsansätze von *D. galeata* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* erfolglos. Für die Diskussion der Qualitätseffekte der Futteralge *D. armatus* siehe Abschnitt 4.2.2.2.

3.3 *Moina macrocopa*

3.3.1 *Moina macrocopa* auf auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.3.1.1 Ergebnisse

3.3.1.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* war die Lebensspanne der Versuchstiere der Art *M. macrocopa* durch die Exposition gegenüber HuminFeed® nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$; Log Rank Test, siehe Abbildung 32). Zu beachten ist aber, dass die exponierten Versuchstiere in den Ansätzen mit 0,54 oder 1,08 mM DOC tendenziell länger gelebt haben (Tabelle 30).

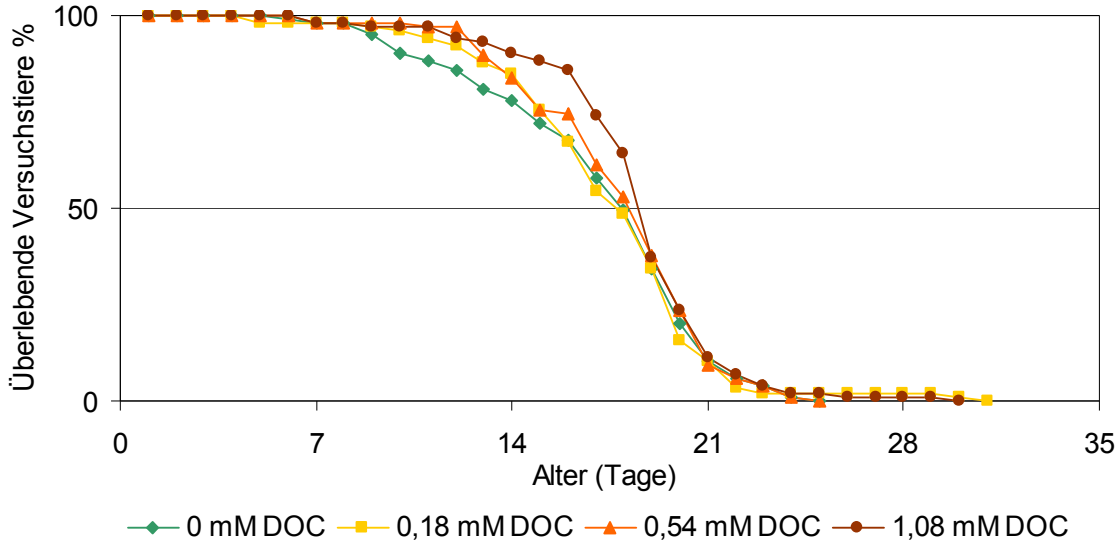

Abbildung 32: Überlebensrate von *M. macrocopa* **(5 Versuchstiere pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist nicht signifikant (ns). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Im Durchschnitt lag die Lebensspanne zwischen 17,4 (in Kontrollgruppe) und 18,7 Tagen (im Ansatz mit 1,08 mM DOC). Wurde die mediane Lebensspanne betrachtet, wiesen die Versuchstiere im Ansatz mit 0,54 mM DOC (mit 18,1 Tage) und im Ansatz mit 1,08 mM DOC (mit 18,5 Tage) eine leicht erhöhte Lebensspanne im Vergleich zum Kontrollansatz (mit 17,5 Tage) auf. Der Ansatz, dem 0,18 mM DOC zugesetzt wurde, unterscheidet sich hinsichtlich der medianen und durchschnittlichen Lebensspanne kaum von der Kontrollgruppe (Tabelle 30).

Tabelle 30: Lebensdauertest von *M. macrocopa* **(5 Versuchstiere pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle in allen mit HuminFeed® Ansätzen ist nicht signifikant (ns). Alle Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	17,5	100	17,4	100	23,5	100	
0,18	17,5	100,1	17,7	101,7	25,5	108,5	= 0,97 ns
0,54	18,1	103,7	18	104	22,5	95,7	= 0,53 ns
1,08	18,5	105,9	18,7	107,5	26	110,6	= 0,13 ns

Die maximale Lebensspanne unterscheidet sich kaum zwischen der Kontrolle und dem Ansatz mit 0,54 mM DOC. In den andren Ansätzen zeigte sie eine Verlängerung, so lebte das letzte Versuchstier im Ansatz mit 0,18 mM DOC zwei Tage (Erhöhung um ca. 9%) und im Ansatz mit 1,08 mM DOC ca. 3 Tage (Erhöhung um ca. 11%) länger als im Kontrollansatz. Die maximale Lebensspanne ist jedoch aufgrund ihrer Beschränkung auf ein einzelnes Versuchstier für sich allein stehend nicht besonders aussagekräftig.

3.3.1.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 4-5 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *M. macrocopa* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. Im Reproduktionstest wurde kein deutlicher Unterschied zwischen den exponierten Versuchstieren und der Kontrolle erzielt (Abbildung 33). So lag in keiner der Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle vor ($p > 0,05$; ANOVA, Tabelle 31).

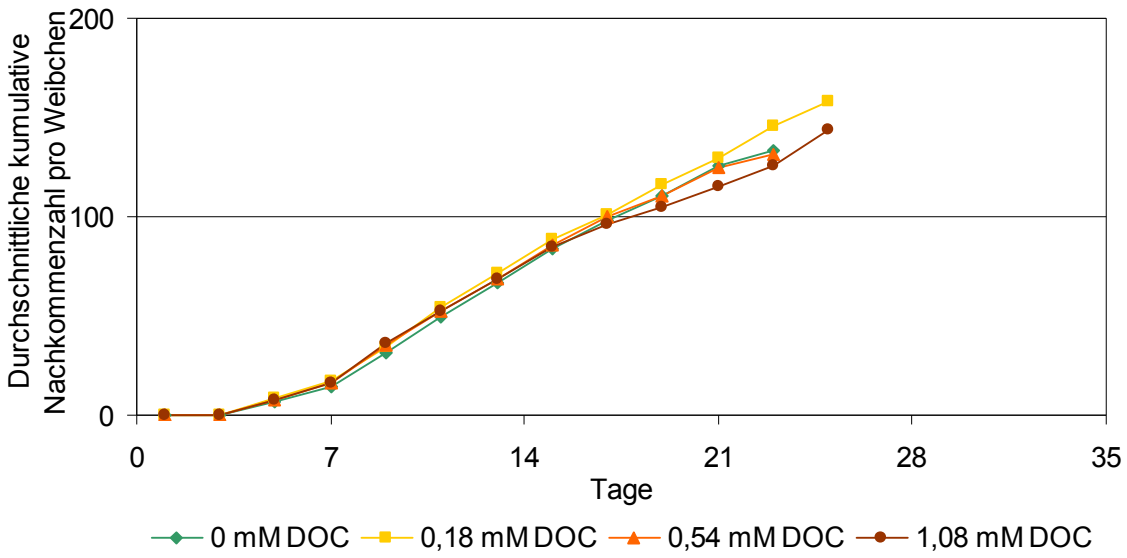

Abbildung 33: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. macrocopa* **(5 Versuchstiere pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist nicht signifikant (ns). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Zu beachten ist aber, dass die exponierten Versuchstiere in Ansätzen mit 0,18 und 1,08 mM DOC tendenziell eine höhere durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl als die Kontrollversuchstiere produziert haben. Zudem zeigte sich eine Erhöhung der Nachkommenzahl in den letzten Überlebenstagen der Versuchstiere in diesen beiden Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle, was allerdings auf die kürzere Lebensdauer der Versuchstiere in der Kontrollgruppe zurückzuführen ist, da *M. macrocopa* sich bis zum Tod reproduzieren kann. Der Ansatz, dem 0,54 mM DOC zugesetzt wurde, unterscheidet sich hinsichtlich der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl kaum von der Kontrollgruppe (Tabelle 31). Die exponierten Weibchen waren bei allen Konzentrationen etwas kleiner als in der Kontrolle (persönliche Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden).

Tabelle 31: Reproduktionstest von *M. macrocopa* **(5 Versuchstiere pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle in allen mit HuminFeed® Ansätzen ist nicht signifikant (ns). Alle Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	133	
0,18	158,4	= 0,37 ns
0,54	131,4	= 0,36 ns
1,08	143,6	= 0,61 ns

3.3.1.1.3 Zusätzlicher Versuch

Zusätzlich wurde ein Versuch mit *M. macrocopa* durchgeführt, in dem die Populationsdichte (5 Versuchstiere pro 100 ml) geändert wurde. So war die Populationsdichte in diesem Versuch 1 Versuchstier pro 100 ml Glas, um Dichtestress zu vermeiden und die genauere Reproduktionsrate ermitteln zu können. Alle anderen Versuchsbedingungen blieben identisch. In allen Ansätzen mit HuminFeed® war die Lebensspanne der Versuchstiere kürzer als in der Kontrolle (Abbildung 24), dieser Unterschied war jedoch nur bei 0,54 mM DOC signifikant (p < 0, 05*; Log Rank Test).

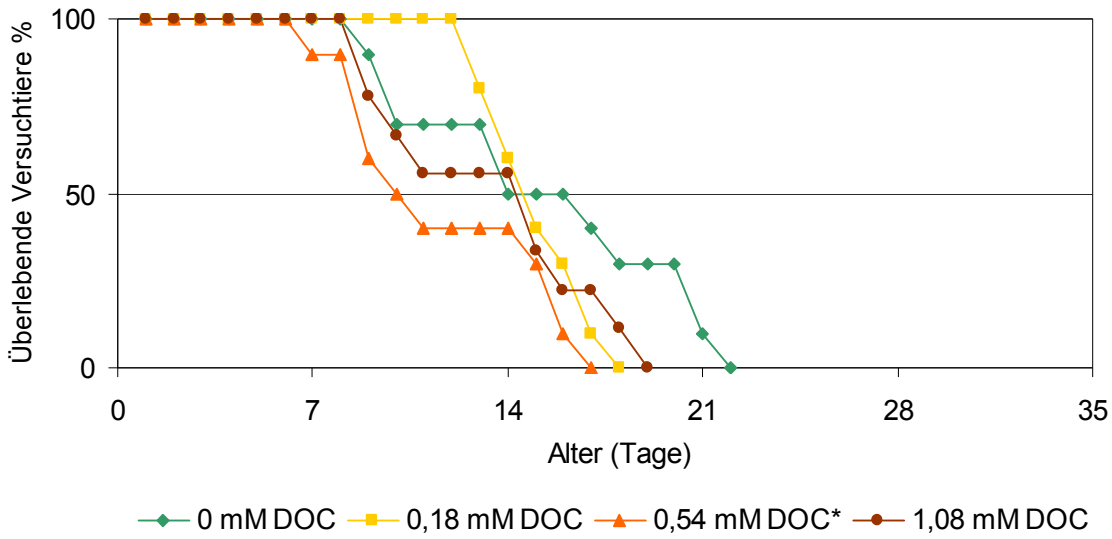

Abbildung 24: Überlebensrate von *M. macrocopa* **(1 Versuchstier pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant.

Es zeigt sich also sowohl eine Verringerung der maximalen Lebensdauer als auch der durchschnittlichen und mediane Lebensdauer in Ansätzen mit HuminFeed® im Verhältnis zur Kontrollgruppe (Tabelle 32). Beispielweise betrug die mediane Lebensspanne der Kontrollgruppe 16 Tage. Zu diesem Zeitpunkt war nur das letzte Versuchstier des Ansatzes mit 0,54 mM DOC noch am Leben.

Tabelle 32: Lebensdauertest von *M. macrocopa* **(1 Versuchstier pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant; ns: nicht signifikant.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	16	100	15,6	100	21	100	
0,18	14,5	90,6	12,2	97,4	17	80,9	= 0,26 ns
0,54	10	62,5	11,9	76,3	16	76,2	< 0,05 *
1,08	14,2	89	13,6	86,9	18	85,7	= 0,20 ns

Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife von *M. macrocopa* und die Zeit zwischen zwei Bruten waren durch die veränderte Populationsdichte nicht beeinflusst. Abbildung 35 stellt die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen dar. HuminFeed® wirkt sich negativ auf die Reproduktion der Versuchstiere aus. Dieser Effekt war jedoch nur beim Ansatz mit 0,54 mM DOC signifikant ($p < 0, 05$*; ANOVA). Auffällig ist aber, dass die Kurven aller Ansätze mit HuminFeed® sich bis Versuchstag 11 kaum vom Kontrollansatz unterschieden.

Die höchste durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen (ca. 102) trat im Kontrollansatz auf und die geringste (71,6) hatten die Weibchen aus dem Ansatz mit 0,54 mM DOC. Dazwischen lagen die Nachkommenzahlen von den Ansätzen mit 0,18 und 1,08 mM DOC (Tabelle 33).

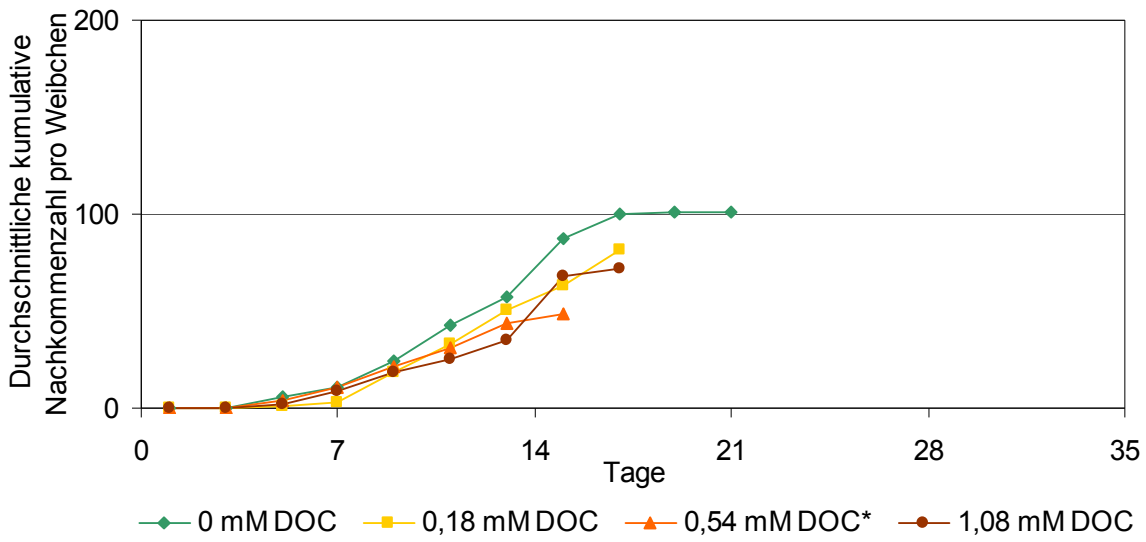

Abbildung 35: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. macrocopa* **(1 Versuchstier pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant.

Tabelle 33: Reproduktionstest von *M. macrocopa* **(1 Versuchstier pro 100 ml)** in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant; ns: nicht signifikant.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	101,2	
0,18	81,3	= 0,73 ns
0,54	49	< 0,05 *
1,08	71,6	= 0,15 ns

3.3.1.2 Diskussion

Bei Fütterung mit *P. subcapitata* in einer **P**opulations**d**ichte von fünf Versuchstieren pro 100 ml (PD5) zeigten einige Lebensparameter von *M. macrocopa* positive Tendenzen, wenn die Versuchstiere gegenüber HuminFeed® exponiert wurden. So lebten die Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® durchschnittlich länger und produzierten mehr Nachkommen als in der Kontrolle (Abbildungen 32 und 33). Die exponierten Weibchen waren bei allen Konzentrationen etwas **kleiner** als in der Kontrolle (persönliche Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). Daher ist

anzunehmen, dass die **vorhandenen Ressourcen** zwischen dem somatischen Wachstum, Reproduktion und Lebensspanne **verteilt** wurden (Lampert et al. 1994).

Wenn die mit *P. subcapitata* gefütterten *M. macrocopa* in einer **P**opulations**d**ichte von einem Versuchstier pro 100 ml (PD1) angesetzt wurden, wirkte sich HuminFeed® negativ auf Lebensspanne und Reproduktion von Versuchstieren aus (Abbildungen 34 und 35). Diese Auswirkungen waren jedoch nur im Ansatz mit 0,54 mM DOC signifikant (Tabellen 34 und 35). Die hier festgestellten negativen Effekte beruhen vermutlich auf eine toxische (aber nicht tödliche) Wirkung vom HuminFeed®.

Selye (1970) hat das Postulat aufgestellt, dass jeglicher Stress eine generelle und nicht spezifische Antwort provoziert (**generalisiertes Anpassungssyndrom**). Die Stressreaktionen beinhalten vor allem Synthese von heat shock Proteins und Antioxidantien (Parsons 1995). War ein Organismus einem Stressor ausgesetzt, führt dies durch das Generalisierte Anpassungssyndrom zu einer **mittleren Resistenz** auch gegenüber **anderen** Stressoren. So könnte laut Steinberg et al. (2008) milder chemischer Stress durch Huminstoffe dazu führen, dass das chemische Schutzsystem (Biotransformation, Stressproteine, antioxidative Enzyme) trainiert wird und damit eine Lebensverlängerung einhergeht.

In verschiedenen Versuchen unter anderem mit *Moina* wurde ermittelt, dass ab einer bestimmten Individuendichte der sogenannte Dichtestress auf die Tiere wirkt (Martínez-Jerónimo et al. 2007). Dieser Dichtestress könnte auch in Versuch PD5 und der vorangegangenen Biomassezucht auf die Tiere gewirkt haben, da hier 5 Individuen in 100 ml Medium gehalten wurden. Die dadurch induzierte Stress-Reaktion könnte zur **multiplen Stressresistenz** geführt haben, so dass die Versuchstiere auch an den Stress, der durch den HuminFeed® im Medium ausgelöst wurde, relativ gut akklimatisiert waren. Das würde erklären, warum im Versuch PD5 (im Gegensatz zum Versuch PD1) eine tendenziell Verlängerung der Lebensspanne bei den Ansätzen, die HuminFeed® enthielten, aufgetreten ist. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass der Versuch PD1 lediglich einmal durchgeführt wurde und sich das Ergebnis somit auf einen einzigen Wert

stützt. Zur statistischen Absicherung sollte der Versuch PD1 mindestens einmal wiedergeholt werden.

Die hier festgestellten Ergebnisse waren anderes als die Versuchsdaten mit *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* von Steinberg et al. (2010b), die nachgewiesen haben, dass eine Exposition gegenüber brasilianischer Huminstoffe signifikante negative Effekte auf die Zahl der Nachkommen und signifikante positive Effekte auf das Lebensspanne. Sehr wahrscheinlich liegen diese Unterschiede in dem Versuchsdesign und der **Qualität** der verwendeten Huminstoffe begründet, da die Huminstoffe unterschiedlicher Qualitäten unterschiedliche Effekte erzielen können (Steinberg et al. 2006).

Die Tatsache, dass phänotypische Lebenbsparameter (z. B. Lebensspanne und Reproduktion) von *M. macrocopa* bei Fütterung mit *P. subcapitata* nicht von HuminFeed® signifikant beeinflusst wurden, deuten nicht unbedingt darauf hin, dass die Versuchstiere auf andere Ebenen (molekularische und biochemische) nicht beeinflusst wurde. Biochemischen und molekularische Aspekten wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Das bleibt in weiteren Studien zu überprüfen.

3.3.2 *Moina macrocopa* auf *Monoraphidium minutum*

3.3.2.1 Ergebnisse

3.3.2.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* wirkte sich HuminFeed® in allen getesteten Konzentrationen positiv auf die Lebensspanne von *M. macrocopa* aus (Abbildung 36). Generell lassen sich lebensverlängernde Effekte mit zunehmender Konzentration vom HuminFeed® beobachten. Im Ansatz mit 0,18 mM DOC erreichten die Unterschiede zur Kontrolle jedoch keinen signifikanten Wert ($p > 0,05$; Log Rank Test; siehe Tabelle 34).

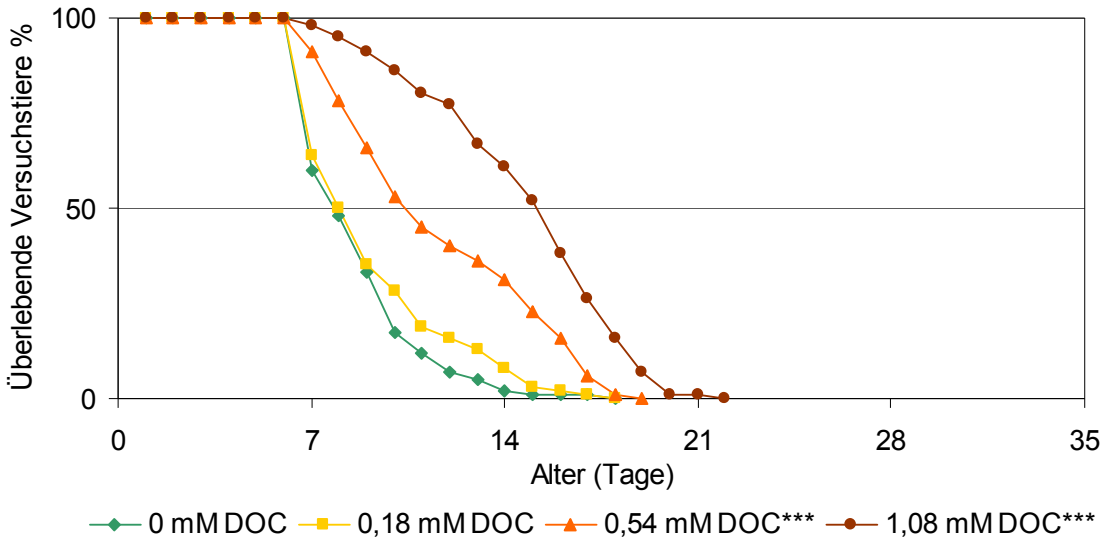

Abbildung 36: Überlebensrate von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Während die Überlebensrate im Kontrollansatz und im mit 0.18 mM DOC Ansatz am Tag 7 steil abfällt, waren über 90% der Versuchstiere im Ansätzen mit 0,54 und 1,08 mM noch am Leben. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe höchst signifikant bei Ansätzen mit 0,54 und 1,08 mM DOC ($p < 0,001$***; Log Rank Test). So wurde die mediane Lebensspanne der Versuchstiere um 34% im Ansatz mit 0,54 mM DOC und um ca. 90% im Ansatz mit 1,08 mM DOC erhöht (Tabelle 34). Im Durchschnitt lebten die Versuchstiere im Ansatz mit 1,08 mM DOC ca. 15 Tage und im Ansatz mit 0,54 mM DOC 11,9 Tage, während

die durchschnittliche Lebensspanne der Versuchstiere im Kontrollansatz nur 8,8 Tage war. Auch lässt sich eine Erhöhung der maximalen Lebensspanne der Versuchstiere mit zunehmender Konzentration vom HuminFeed® beobachten (Tabelle 34).

Tabelle 34: Lebensdauertest von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant; ns: nicht signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	7,8	100	8,9	100	15,5	100	
0,18	7,9	101,2	9,4	105,9	16	103,2	= 0,13 ns
0,54	10,5	134	11,9	133	17,5	112,9	< 0,001 ***
1,08	14,9	190,6	15	168,7	20	129	< 0,001 ***

3.3.2.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 4-5 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *M. macrocopa* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. In diesem Versuch lässt sich generell eine Zunahme der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl pro Weichen der Art *M. macrocopa* mit zunehmender HuminFeed®-Konzentration beobachten (Abbildung 37). Dieser Effekt war jedoch im Ansatz mit 0,18 mM DOC nicht signifikant (p > 0,05; T-Test; siehe Tabelle 35).

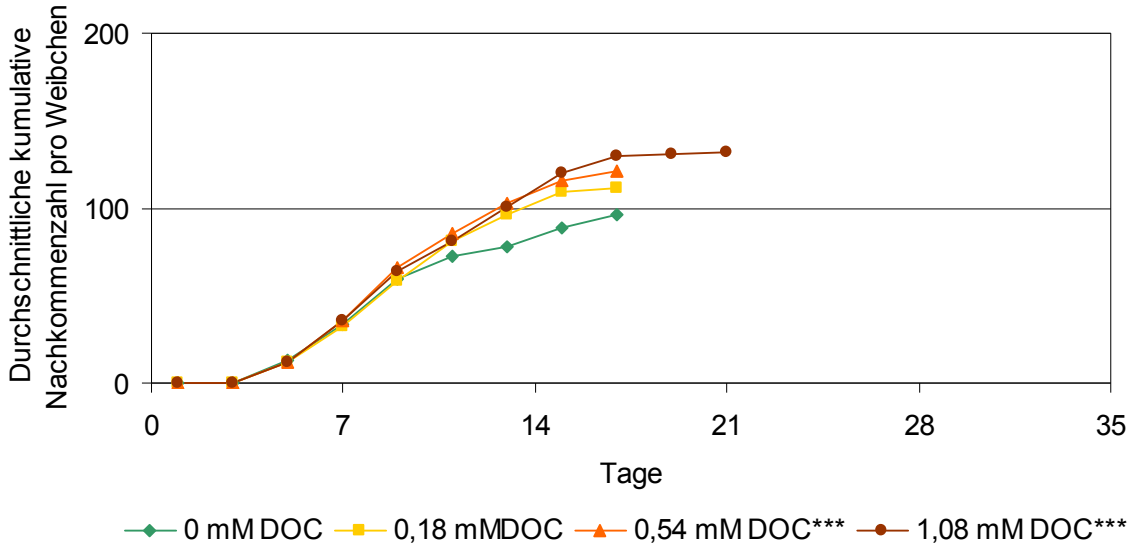

Abbildung 37: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die Gesamtnachkommenzahl pro Weibchen des Ansatzes mit 0,54 mM DOC lag bei 120,9 Nachkommen pro Weibchen über der Gesamtnachkommenzahl des Kontrollansatzes (96,7 Nachkommen pro Weibchen), was eine höchste signifikante Erhöhung um ca. 25% im Verhältnis zur Kontrolle darstellt ($p < 0{,}001$***; T-Test). Die höchste Gesamtnachkommenzahl wurde mit durchschnittlich 132,3 Nachkommen pro Weibchen beim Ansatz mit 1,08 mM DOC gefunden. In diesem Ansatz ist eine höchst signifikante Erhöhung der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl um ca. 37% im Verhältnis zur Kontrolle erzielt worden ($p < 0{,}001$***; T-Test).

Tabelle 35: Reproduktionstest von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant; ns: nicht signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	96,7	
0,18	111,4	= 0,18 ns
0,54	120,9	< 0,001 ***
1,08	132,3	< 0,001 ***

Im Reproduktionstest konnten signifikante Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (Pearson-Korrelation, R= 0,97; $p \leq 0,05$*) festgestellt werden.

In diesem Versuch war es auffällig, dass die Quantität (Zahl pro Weibchen und Brut) und die Qualität (Große, Form und Schwimmgeschwindigkeit) der Nachkommen der Versuchstiere (mit oder ohne HuminFeed®) sich in den letzten Versuchstagen verschlechtert haben.

3.3.2.2 Diskussion

Die Ergebnisse des Versuchs von *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* unter chemischem Stress ausgelöst durch HuminFeed® zeigten, dass der erzielte Lebensverlängerungseffekt nicht auf Kosten, sondern zusammen mit einer Erhöhung der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl pro Weibchen stattfindet (Abbildungen 36 und 37; Tabellen 34 und 35). Dieses Ergebnis ist daher **nicht konsistent** mit der Disposable Soma Theorie. Die hier gefundenen Ergebnisse stimmen sehr gut mit den bereits veröffentlichen Daten überein, da bei den exponierten Versuchstieren der Cladocere *Daphnia magna* gegenüber HuminFeed® eine Lebensverlängerung festgestellt wurde, darüber hinaus wirkte sich HuminFeed® positiv auf die Reproduktion von *D. magna* aus bei Fütterung mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die eine suboptimale Futterqualität für *D. magna* darstellte (Bouchnak & Steinberg 2010).

Huminstoffe leiten sich unter anderem von **Polyphenolen** wie Ligninen und Tanninen ab (Leenheer & Rostad 2004; Steinberg et al. 2007). Von Polyphenolen ist bekannt, dass sie lebensverlängernde Wirkung besitzen und die Stressresistenz erhöhen (z. B. Leenheer & Rostad 2004). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass sie 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 der Versuchstiere auf den polyphenolischen Bestandteilen der Huminstoffe beruht.

Die erhöhte Nachkommenzahl der exponierten Versuchstiere könnte auf eine

hormonähnliche Wirkung von Huminstoffen zurückzuführen sein, die bei Wirbeltieren wie auch bei Wirbellosen nachgewiesen wurde (Steinberg et al. 2004). Eine weitere Erklärung dafür könnte in der Funktion der Huminstoffe als externe **Energie- und Nährstoffquelle** (Jones 1992, Steinberg et al. 2006) liegen.

3.3.3 *Moina macrocopa* auf *Desmodesmus armatus*

3.3.3.1 Ergebnisse

3.3.3.1.1 Lebensspanne

Die Überlebensrate von Versuchstieren der Art *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Alge *D armatus* ist in der Abbildung 38 gezeigt. Im Durchschnitt wiesen die Versuchstiere mit HuminFeed®-Exposition aller Konzentrationen eine geringere Lebensspanne auf als die Versuchstiere der Kontrollgruppe.

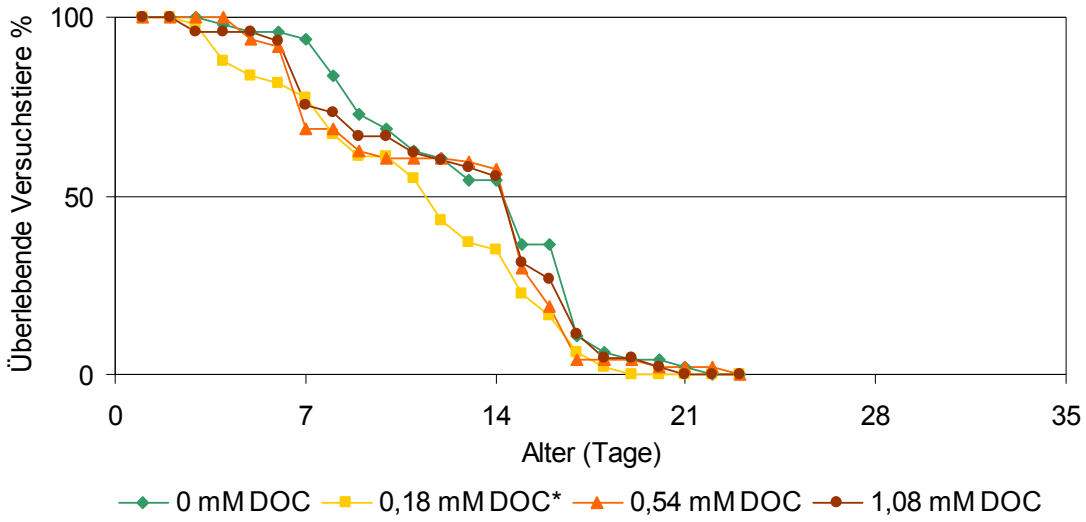

Abbildung 38: Überlebensrate von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe allerdings nur im Ansatz mit 0,18 mM DOC signifikant ($p < 0,05$*; Log Rank Test). In diesem Ansatz lebten die Versuchstiere ca. 2 Tage im Durchschnitt und 3 Tage in der maximalen Lebensdauer kürzer als die Versuchstiere im Kontrollansatz (siehe Tabelle 36). Wurde die mediane Lebensspanne betrachtet, wiesen die Versuchstiere im Ansatz mit 0,54 mM DOC (mit 14,3 Tage) kaum und im Ansatz mit 1,08 mM DOC (mit

14,2 Tage) keine Unterschiede im Vergleich zum Kontrollansatz (mit 14,2 Tage) auf.

Tabelle 36: Lebensdauertest von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant; ns: nicht signifikant.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	14,2	100	13,3	100	21	100	
0,18	11,4	80,2	11,3	85	18	85,7	< 0,05 *
0,54	14,3	100,7	12,9	93,5	22	104,8	= 0,32 ns
1,08	14,2	100	12,8	95,8	20	95,2	= 0,49 ns

3.3.3.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 4-5 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *M. macrocopa* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. HuminFeed® wirkte sich positiv auf die von *M. macrocopa* aus (Abbildung 39).

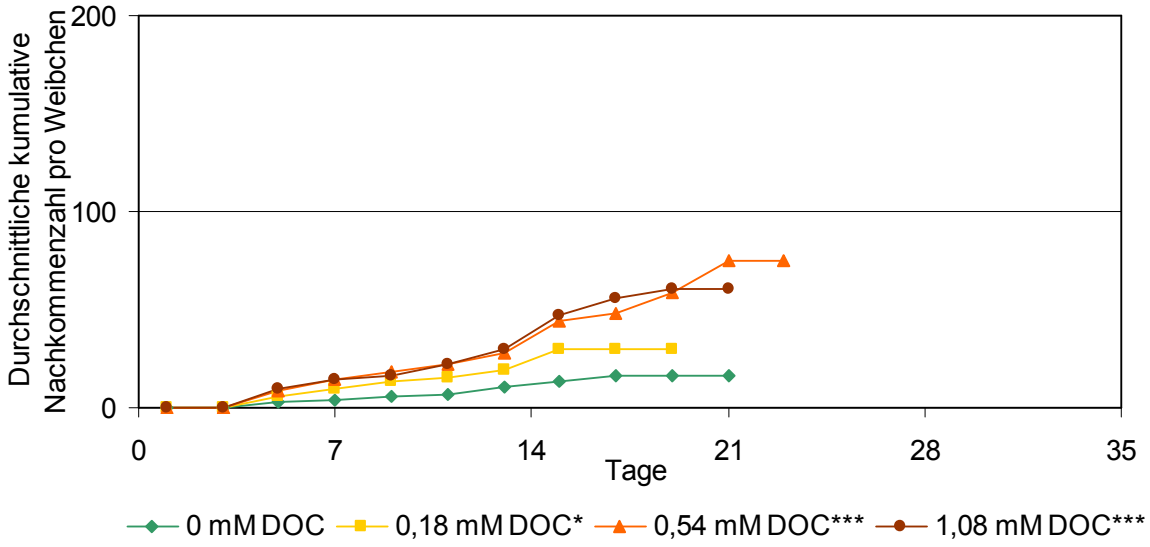

Abbildung 39: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant.

Eine höhere durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen wurde bei allen Ansätzen mit HuminFeed® im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Tabelle 37).

Tabelle 37: Reproduktionstest von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *D. armatus*. Der Unterschied zu der Kontrolle ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	16,1	
0,18	29,8	< 0,05 *
0,54	74,6	< 0,001 ***
1,08	60,6	< 0,001 ***

Die Gesamtnachkommenzahl pro Weibchen des Ansatzes mit 0,18 mM DOC lag bei 29,8 Nachkommen pro Weibchen über der Gesamtnachkommenzahl des Kontrollansatzes (16,1 Nachkommen pro Weibchen), was eine signifikante Erhöhung um ca. 86% im Verhältnis zur Kontrolle darstellt (p < 0,01*; ANOVA). Die höchste Gesamtnachkommenzahl wurde mit durchschnittlich 74,6 Nachkommen pro Weibchen beim Ansatz mit 0,54 mM DOC gefunden. In diesem Ansatz ist eine höchst signifikante Nachkommenzahlerhöhung erzielt worden (p < 0,001***; ANOVA). So lag die erreichte Gesamtnachkommenzahl (74,6 Nachkommen pro Weibchen) in diesem Ansatz über der Gesamtnachkommenzahl des Kontrollansatzes (16,1 Nachkommen pro Weibchen), was eine Steigerung um ca. 364% darstellt. Der Ansatz, dem 1,08 mM DOC zugesetzt wurde, unterscheidet sich ebenso mit einer höchst signifikanten Steigerung um ca. 276% von der Kontrollgruppe (p < 0,001***; ANOVA). So erreichte die durchschnittliche kumulative Zahl der Nachkommen im Ansatz mit 1,08 mM DOC 60,58 Nachkommen pro Weibchen. Auffällig war jedoch, dass die Nachkommen der Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® kleiner als die Nachkommen der Versuchstiere im Kontrollansatz waren (persönliche Beobachtung, nicht gemessen). Ab dem 3. Lebenstag waren die Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® dunkler und kleiner als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden).

3.3.3.2 Diskussion

Bei Fütterung mit *D. armatus* hat HuminFeed® einen negativen Effekt auf die Lebensspanne von *M. macrocopa* erzielt. Dieser Effekt war jedoch nur im Ansatz mit 0,18 mM DOC signifikant (Abbildung 38; Tabelle 36). Im Reproduktionstest ist dagegen ein positiver Effekt vom HuminFeed® festgestellt worden (Abbildung 39). Die erhaltenen Ergebnisse waren im Verhältnis zur Kontrollgruppe signifikant bei 0,18 mM DOC und höchst signifikant in Ansätzen mit 0,54 und 1,08 mM DOC (Tabelle 37). Ab dem 3. Lebenstag waren die Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® etwas kleiner als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). So zeigte sich eine reziprok-proportionale Abhängigkeit der Lebensspanne bzw. des somatischen Wachstums von der Reproduktion in den Ansätzen, denen HuminFeed® zugesetzt wurde. Die hier erhaltenen Ergebnisse könnten daher ein Indiz für die „**Disposable Soma Theorie**“ sein.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Nachkommenzahl in Ansätzen mit HuminFeed® (Abbildung 39) könnte auch sowohl in der **hormonähnlichen** Wirkung der Huminstoffe, die bei Wirbeltieren wie auch bei Wirbellosen nachgewiesen wurde (Steinberg et al. 2004), als auch in ihrer Funktion als externe **Energie- und Nährstoffquelle** (Jones 1992, Steinberg et al. 2006) liegen.

3.4 *Moina micrura*

3.4.1 *Moina micrura* auf auf *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.4.1.1 Ergebnisse

3.4.1.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* wiesen die Versuchstiere der Gruppen, denen HuminFeed® zugesetzt wurde, eine verkürzte Lebensspanne im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 40).

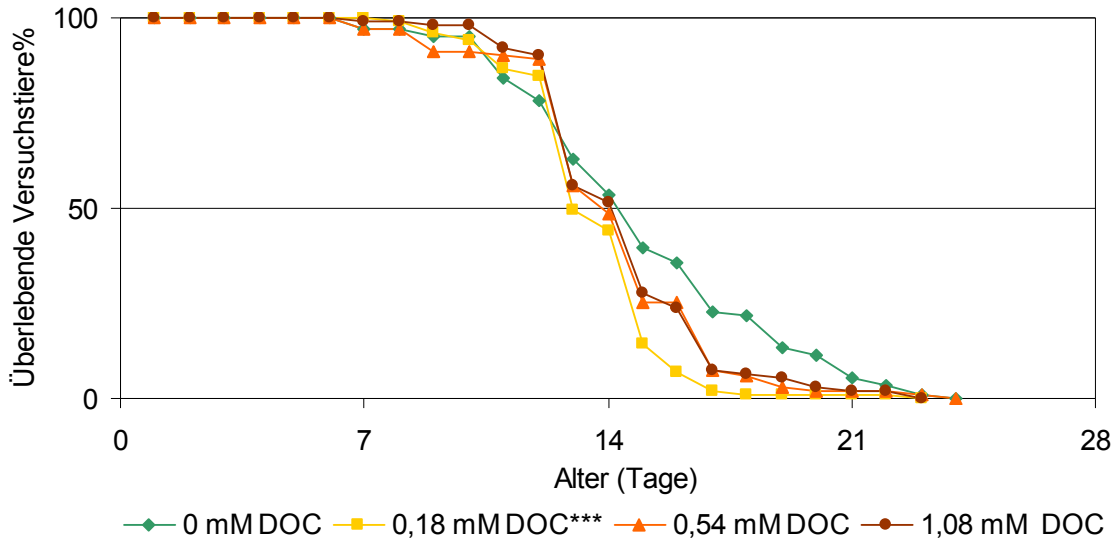

Abbildung 40: Überlebensrate von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe allerdings nur im Ansatz mit 0,18 mM DOC höchst signifikant ($p < 0{,}001$***; Log Rank Test). In diesem Ansatz lebten die Versuchstiere ca. 9% im Durchschnitt und 14% in der maximalen Lebensdauer kürzer als die Versuchstiere im Kontrollansatz (siehe Tabelle 38). Wurde die mediane Lebensspanne betrachtet, wiesen die Versuchstiere im Ansatz mit 0,54 mM DOC und im Ansatz mit 1,08 mM DOC (auch 13,8 Tage) deutliche, aber nicht signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kontrollansatz (14,6 Tage) auf. Weitere Ergebnisse wurden in Tabelle 38 zusammengefasst.

Tabelle 38: Lebensdauertest von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle in allen mit HuminFeed® Ansätzen ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant; ns: nicht signifikant. Alle Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	14,6	100	15,10	100	22	100	
0,18	13,4	92,3	13,82	91,49	19	86,4	< 0,001 ***
0,54	13,8	94,7	14,29	94,65	22,5	102,3	= 0,09 ns
1,08	13,8	94,7	14,60	96,69	22	100	= 0,11 ns

3.4.1.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 4-5 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *M. micrura* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. HuminFeed® verursachte eine Verringerung der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl pro Weibchen *M. micrura*. Diese Verringerung war jedoch nur in Ansätzen mit 0,18 und 0,54 mM DOC signifikant (p ≤ 0,05*; ANOVA). Abbildung 41 zeigt die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei den verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen auf *P. subcapitata*.

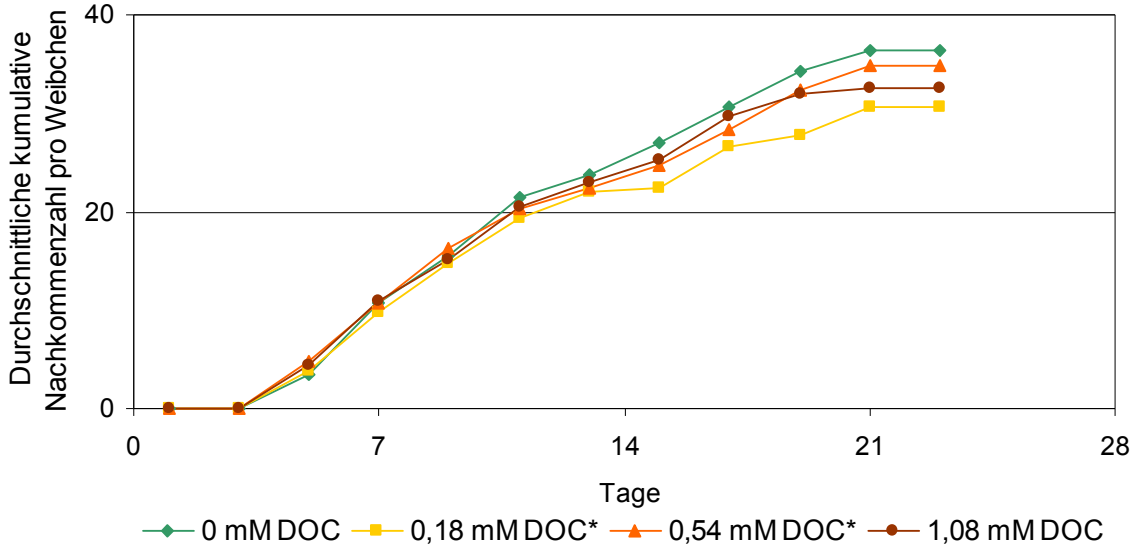

Abbildung 41: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau (p ≤ 0,05*) signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die höchste Gesamtnachkommenzahl wurde mit durchschnittlich 36,4 Nachkommen pro Weibchen bei der Kontrolle nachgewiesen. Sie lag somit über der durchschnittlichen Gesamtnachkommenzahl aller HuminFeed® Ansätze (siehe Tabelle 39).

Tabelle 39: Reproduktionstest von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p \leq 0,05$*) signifikant; ns: nicht signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	36,4	
0,18	30,7	= 0,05 *
0,54	34,8	< 0,05 *
1,08	32,5	= 0,34 ns

Ein negativer Effekt von HuminFeed® auf das Wachstum von *M. micrura* ist beobachtet worden. Die Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® waren kleiner und dunkler als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden).

3.4.1.2 Diskussion

Bei Fütterung mit *P. subcapitata* hat HuminFeed® einen **negativen** Effekt auf die Lebensspanne von *M. micrura* erzielt (Abbildung 40). Dieser Effekt war jedoch nur im Ansatz mit 0,18 mM DOC signifikant (Tabelle 38). Darüber hinaus wurden auch im Reproduktionstest **negative** Effekte vom HuminFeed® festgestellt (Abbildung 41). Dieser Effekt war jedoch nur in Ansätzen mit 0,18 und 0,54 mM DOC signifikant (Tabelle 39). Die teilweise signifikant höhere durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen in der Kontrollgruppe bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* liegt wahrscheinlich an der höheren Überlebensrate der Kontrollversuchstiere im Vergleich zu den gegenüber HuminFeed® exponierten Versuchstieren begründet, da *M. micrura* sich bis zum Tod reproduzieren kann. Ergebnisse dieser Arbeit sind daher **nicht konsistent** mit der Disposable Soma Theorie.

Die Struktur der Huminstoffe enthält verschiedene **Bausteine**. Unter anderem könnten die bioverfügbaren Aminosäuren, Aminozucker und Kohlenhydrate einen **lebensverkürzenden Effekt** hervorrufen (Steinberg & Menzel 2009).

Obwohl die hier verwendete *M. micrura* von einem Klon stammte, welcher aus einem huminstoffhaltigen oligotrophischen Lajes Reservoir (Piraí, Rio de Janeiro State, Brasilien) entnommen wurde, wurden all ihre Lebensparameter (Lebensspanne, Reproduktion, Wachstum) negativ vom verwendeten Huminstoff HuminFeed® beeinflusst. Steinberg et al. (2006) berichtete, dass die Effekte von Huminstoffen von der Quantität (Konzentration) und der Qualität des verwendeten Huminstoffes abhängig sind, da nicht alle Präparate der Huminstoffe identische Effekte erzielen. Dies könnte das hier erzielte Ergebnis erklären. Die hier erzielten negativen Effekte vom HuminFeed® auf die Reproduktion und auf das Wachstum von *M. micrura* beruhen vermutlich auf eine **toxische (aber nicht tödliche) Wirkung** von HuminFeed® (Steinberg et al. 2010b). Vermutlich könnte HuminFeed® auf einen Stoffwechselprozess, der für die Entwicklung der Eier zu den Jungetieren der Art *D. magna* eine wichtige Rolle spielt, einen negativen Einfluss nehmen.

Die Populationsdicht von 5 Versuchstiere pro 100 ml könnte Dichtestress auslösen (Martínez-Jerónimo et al. 2007). Dann wirkten die zwei simultanen Stressoren (Dichtestress und chemische Stress ausgelöst durch HuminFeed®) **additiv oder sogar synergistisch** auf *M. micrura*.

3.4.2 *Moina micrura* auf *Monoraphidium minutum*

3.4.2.1 Ergebnisse

3.4.2.1.1 Lebensspanne

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* wiesen die Versuchstiere der Gruppen, denen HuminFeed® zugesetzt wurde, eine verkürzte Lebensspanne im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 42).

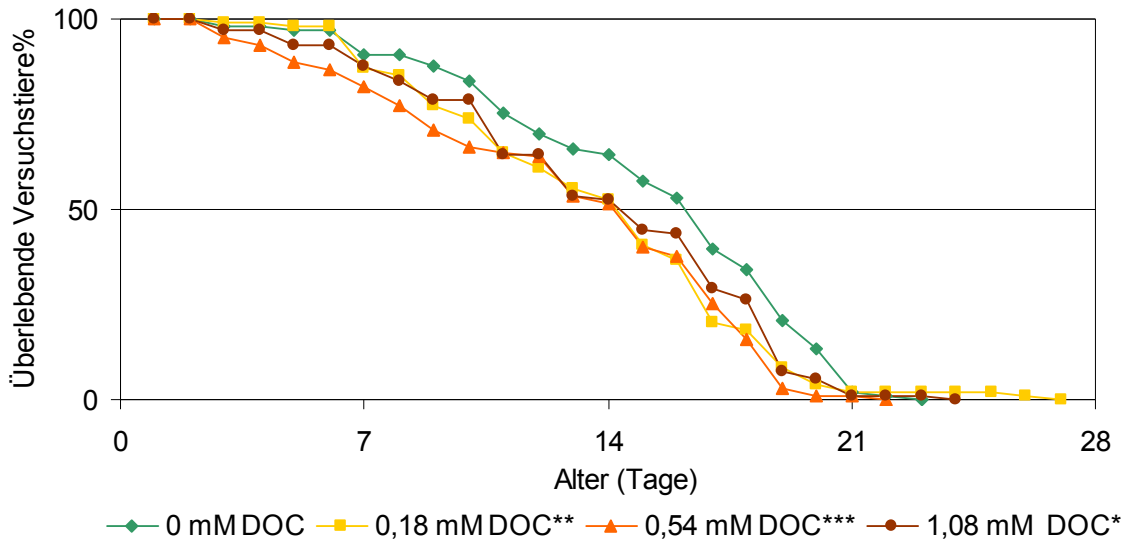

Abbildung 42: Überlebensrate von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist auf dem Niveau ($p < 0,05$*) signifikant; ($p < 0,01$**) hoch signifikant und ($p < 0,001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe im Ansatz mit 0,18 mM DOC hoch signifikant, mit 0,54 mM DOC höchst signifikant und mit 1,08 mM DOC signifikant (Log Rank Test). Im Durchschnitt wiesen die Versuchstiere mit HuminFeed®-Exposition aller Konzentrationen eine geringere Lebensspanne auf als die Versuchstiere der Kontrollgruppe. So lebten die Versuchstiere durchschnittlich in Ansätzen mit 0,18 oder 1,08 mM DOC ca. 2 Tage und im Ansatz mit 0,54 mM DOC ca. 3 Tage kürzer als die Versuchstiere im Kontrollansatz (siehe Tabelle 40). Wurde die mediane Lebensspanne betrachtet, wiesen die Versuchstiere der mit HuminFeed® Ansätzen auch sehr deutliche Unterschiede zur Kontrolle auf. Beispielweise zeigten die Versuchstiere im Ansatz mit 0,54 mM DOC eine Verringerung der medianen Lebensspanne um ca. 15% (für weitere Einzelheiten siehe Tabelle 40).

Tabelle 40: Lebensdauertest von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle in allen mit HuminFeed® Ansätzen ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant; (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant. Alle Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	Median		Mittelwert		Maximal		p
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	für die gesamte Lebensdauer
0	15,7	100	15,4	100	21	100	
0,18	14,1	89,7	13,8	89,72	23	109,5	< 0,01**
0,54	13,4	85,4	13,1	85,34	20	95,2	< 0,001***
1,08	13,6	86,5	14	90,72	21,5	102,4	< 0,05*

Die maximale Lebensspanne der Kontrolle war in Ansätzen mit 0,18 mM DOC bzw. mit 1,08 mM DOC länger als im Kontrollansatz (Tabelle 40). Die maximale Lebensspanne ist jedoch aufgrund ihrer Beschränkung auf ein einzelnes Versuchstier für sich allein stehend nicht besonders aussagekräftig.

3.4.2.1.2 Reproduktion

Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* betrug die Dauer der Entwicklung bis zur Reife 4-5 Lebenstage bei den Versuchstieren der Art *M. micrura* (mit oder ohne HuminFeed®). Die Zeit zwischen zwei Bruten betrug ca. 2 Tage bei allen Versuchstieren. Generell produzierten die exponierten Weibchen mehr Nachkommen als in der Kontrolle (Abbildung 43), signifikante Effekte traten jedoch nicht auf (p > 0,05; T-Test; siehe Tabelle 41).

Die deutlichen aber nicht signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl zwischen dem Kontrollansatz und den Ansätzen mit HuminFeed® traten erst am 17. bzw. 19. Versuchstag auf.

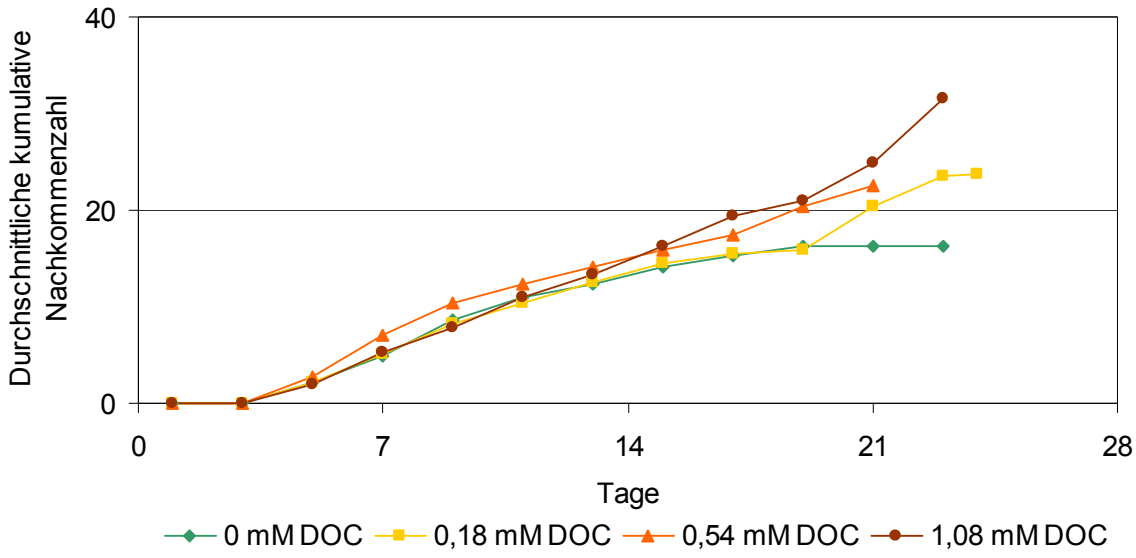

Abbildung 43: Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist nicht signifikant. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Tabelle 41: Ergebnisse des Reproduktionstests von *M. micrura* in Abhängigkeit von HuminFeed® (Konzentrationen in mM DOC) bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*. Der Unterschied zur Kontrolle ist nicht signifikant (ns). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Ansatz mM DOC	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
0	16,3	
0,18	23,7	= 0,62 ns
0,54	22,5	= 0,47 ns
1,08	31,5	= 0,09 ns

Die Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® waren kleiner als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden).

3.4.2.2 Diskussion

Bei Fütterung mit *M. minutum* hat HuminFeed® einen **negativen** Effekt auf die Lebensspanne von *M. micrura* erzielt (Abbildung 42). Dieser Effekt war in allen Ansätzen mit HuminFeed® signifikant (Tabelle 40). Im Reproduktionstest ist dagegen ein **positiver** Effekt vom HuminFeed® festgestellt worden (Abbildung 43). Die erhaltenen Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant im Verhältnis zur

Kontrollgruppe, also nur tendenziell (Tabelle 41). So haben die exponierten Versuchstiere in den **letzten Versuchstagen** tendenziell eine höhere durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl als die Kontrollversuchstiere produziert, was allerdings auf die kürzere maximale Lebensdauer der Versuchstiere in der Kontrollgruppe zurückzuführen ist, da *M. micrura* sich bis zum Tod reproduzieren kann. Die Versuchstiere in Ansätzen mit HuminFeed® waren etwas **kleiner** als die Versuchstiere im Kontrollansatz (Beobachtung, nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). So zeigte sich eine reziprok-proportionale Abhängigkeit der Lebensspanne bzw. des somatischen Wachstums von der Reproduktion in den Ansätzen, denen HuminFeed® zugesetzt wurde. Die hier erhaltenen Ergebnisse könnten daher ein Indiz für die „**Disposable Soma Theorie**“ sein.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Nachkommenzahl in Ansätzen mit HuminFeed® könnte auch sowohl in der **hormonähnlichen** Wirkung der Huminstoffe, die bei Wirbeltieren wie auch bei Wirbellosen nachgewiesen wurde (Steinberg et al. 2004), als auch in ihrer Funktion als externe **Energie- und Nährstoffquelle** (Jones 1992, Steinberg et al. 2006) liegen.

3.4.3 *Moina micrura* auf *Desmodesmus armatus*

Da *M. micrura* in mehreren Vorkulturen die Alge *D. armatus* nicht fressen bzw. nicht verdauen konnte, war es leider nicht möglich, einen Versuch von *M. micrura* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* durchzuführen. Allerdings soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass in wenigen Fällen mehrere Vorkulturen die Wasserflöhe der Art *M. micrura* die Alge *D. armatus* fressen konnten und danach sich reproduzierten. Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife war jedoch relativ lang (8 Tage) im Vergleich zu anderen Futteralgenqualitäten (3-4 Tage). Außerdem war die **N**ach**k**ommenzahl pro überlebendes **W**eibchen und **B**rut relativ klein (ca. 3 NK/W.B) im Vergleich zur Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut bei anderen Futteralgenqualitäten. Die neugeborenen Nachkommen sind nach wenigen (maximal 10-15) Tagen bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* gestorben. Dabei wurde keine Reproduktion der nächsten Generation beobachtet. Damit

waren die Versuchsansätze von *M. micrura* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* erfolglos. Für die Diskussion der Qualitätseffekte der Futteralge *D. armatus* auf *M. micrura* siehe Abschnitt **4.2.4.2**.

4 Futteralgenqualitäten

4.1 Analyse der Futteralgen

Der Einfluss verschiedener Futteralgenqualitäten (*Pseudokirchneriella subcapitata, Monoraphidium minutum* und *Desmodesmus armatus*) auf die Lebensparameter von Wasserflöhen (*Daphnia magna*, *D. galeata*, *Moina macrocopa* und *M. micrura*) steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Welche Inhaltsstoffe ausschlaggebend sind, wurde durch die Analyse sowohl der Fettsäurezusammensetzung (hauptsachlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren = **p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cids PUFA) und Aminosäurezusammensetzung als auch der Nährstoffzusammensetzung (hauptsachlich die Elemente: Kohlenstoff C, Phosphor P und Stickstoff N) versucht zu klären. In folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der durchgeführten Analyse dargestellt.

4.1.1 Fettsäurezusammensetzung

Um die Auswirkung der biochemischen Zusammensetzung der ausgesuchten Futteralgen auf Lebensparameter von vier Wasserflöhen untersuchen zu können, wurde die Fettsäurezusammensetzung, eine der wichtigsten Algenqualitätsmerkmale, von den Algen *P. subcapitata, M. minutum* und *D. armatus* analysiert. Dabei unterschieden sich diese Algen in ihrer Fettsäurezusammensetzung deutlich voneinander (Tabelle 42).

Bei der Alge *P. subcapitata* kamen vor allem die dreifach ungesättigte α-Linolensäure (C18:3n-3) mit annähernd 60%, die einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) mit 8,7% und die zweifach ungesättigte Linolsäure (C18:2) mit ca. 8% der Gesamtfettsäuren vor. Der Anteil aller gesättigten Fettsäuren (C14:0, C16:0 und C18:0) betrug im ca. 20% an den Gesamtfettsäuren. Die dreifach ungesättigte γ-Linolensäure (C18:3n- 6) betrug nur 2% an den Gesamtfettsäuren. Die langkettigen hoch ungesättigten Fettsäuren (C 20:4; C20:5; C22:5n-6; C22:5n-3 und C22:6) wurden nur als Spuren detektiert (< 0,01 mg/g).

Tabelle 42: Fettsäuregehalt der Futteralgen (mg/g Algenbiomasse); ∑ FS: Summe der Fettsäure. Prozentanteile einzelner Fettsäuren an der Summe aller Fettsäuren der Futteralgen sind auch gezeigt. (--): unter den Bestimmungsgrenzen 0,01 mg/ g

Fettsäure	*Pseudokirchneriella subcapitata*		*Monoraphidium minutum*		*Desmodesmus armatus*	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
C14:0	0,05	0,8	0	0	0	0
C16:0	1,3	19	0,05	22,5	0,08	12,7
C16:1	0,05	0,8	0,01	5,6	0,03	4,4
C18:0	0,01	0,1	0	0	--	
C18:1	0,6	8,7	0,05	24,2	0,05	7,5
C18:2	0,5	8	0,02	8,5	0,1	19,4
C18:3n-6	0,1	2	0	0	0,02	2,7
C18:3n-3	3,8	57,3	0,08	37,5	0,3	48,7
C20:4	--		--		--	
C20:5	--		--		--	
C22:5n-6	--		--		--	
C22:5n-3	--		--		--	
C22:6	--		--		--	
∑ FS	7,4		0,2		0,7	

Die Alge *M. minutum* enthielt 22,5% einer gesättigten Fettsäure (C16:0) und ca. 30% einfache ungesättigte Fettsäuren (Palmitoleinsäure C16:1 und Ölsäure C18:1), während die ungesättigte α-Linolensäure (C18:3n-3) 37,48% und Linolsäure (C18:2) 8,5% an den Gesamtfettsäuren betrugen. Die langkettige hoch ungesättigte Fettsäuren (C 20:4; C20:5; C22:5n-6 und C22:5n-3), die gesättigte Fettsäuren (C14:0; C18:0) und die dreifach ungesättigte γ-Linolensäure (C18:3n-6) wurden nicht detektiert.

Die dreifach ungesättigten Fettsäuren der Alge *D. armatus* setzten sich aus α-Linolensäure (C18:3n-3) und γ-Linolensäure (C18:3n-6) zusammen und bilden 51,4% an den Gesamtfettsäuren. Gesättigte Fettsäuren sind mit ca. 13% aller Fettsäuren vertreten. Einen wesentlichen Bestandteil stellt die zweifach ungesättigte Linolsäure (C18:2) mit 19,4% der Gesamtfettsäuren dar. Die einfach ungesättigten Fettsäuren (Palmitoleinsäure C16:1 und Ölsäure C18:1) kamen mit ca. 12% der Gesamtfettsäuren vor. Die langkettigen hoch ungesättigten Fettsäuren (C 20:4; C20:5; C22:5n-6 und C22:5n-3) und die gesättigte Fettsäure (C14:0) wurden nicht detektiert.

Die Futteralgen unterschieden sich nicht nur in ihrem Fettsäuremuster, sondern auch im spezifischen Fettsäuregehalt (Tabelle 42). Der Unterschied zwischen dem spezifischen Gesamtfettsäuregehalt der Alge *M. minutum* (0,2 mg/g Algenbiomasse) und der Alge *D. armatus* (0,7 mg/g Algenbiomasse) war relativ gering. Dagegen unterschied sich der spezifische Gesamtfettsäuregehalt der Alge *P. subcapitata* mit 7,4 mg Fettsäure pro g Algenbiomasse sehr stark vom Gesamtfettsäuregehalt der beiden anderen Algen.

4.1.2 Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung (Anwesenheit sowohl der essentiellen als auch der nicht-essentiellen Aminosäuren) der drei Algen ist fast identisch (Tabelle 43). Jedoch **fehlt** Taurin in *D. armatus* und Ornithin in *P. subcapitata*. Außerdem ist die Aminsäure Phosphoethanolamin weder in *D. armatus* noch in *M. minutum* nachweisbar.

Die drei Algen unterschieden sich **wesentlich** sowohl im Gehalt an bestimmten Aminosäuren als auch im Prozentanteil einzelner Aminosäuren an der Summe aller Aminosäuren. Tabelle 43 zeigt beispielsweise einen großen Unterschied bei den Aminosäuren Arginin und Histidin. So enthalten die Algen *D. armatus* (1,6) und *M. minutum* einen 1,4fach **höheren** Argininanteil als *P. subcapitata*. Außerdem zeigte die Alge *D. armatus* mit 2 g/100 g **A**lgen**t**rocken**m**asse (ATM) eine 2,2 mal höhere Menge an Histidin als *P. subcapitata* und *M. minutum* (0,9 g/100 g ATM). Auffällig ist aber auch, dass die Alge *D. armatus* höhere Mengen an den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Cystin als die Algen *P. subcapitata* und *M. minutum* aufweist.

Hinsichtlich des gesamten Aminosäurengehaltes zeigten die Algen *P. subcapitata* und *M. minutum* **kaum** Unterschiede. Die Menge der Gesamtaminosäuren war bei *D. armatus* mit 59,3 g pro 100 g ATM 1,3 mal höher als bei *P. subcapitata* (44,5 g/100 g ATM) und *M. minutum* (45,9 g/100 g ATM).

Tabelle 43: Aminosäuregehalt der Futteralgen (g/100 g Algentrockenmasse); ∑ AS: Summe der Aminosäure. Prozentanteile einzelner Aminosäuren an der Summe aller Aminosäuren von den Futteralgen sind auch gezeigt. (--): unter den Bestimmungsgrenzen 0,05 g/100 g

Aminosäure	*Pseudokirchneriella subcapitata*		*Monoraphidium minutum*		*Desmodesmus armatus*	
	g/100 g	%	g/100g	%	g/100 g	%
Asparaginsäure	4,2	9,5	4,3	9,4	6,3	10,6
Threonin	2,2	4,9	2,3	5,0	2,9	4,9
Serin	1,9	4,4	2,0	4,3	2,5	4,3
Glutaminsäure	4,8	10,7	5,2	11,4	7,2	12,1
Prolin	2,8	6,4	2,6	5,6	2,8	4,7
Glycin	2,9	6,5	3,0	6,5	4,0	6,8
Alanin	4,1	9,3	4,4	9,5	4,9	8,2
Valin	2,7	6,0	2,6	5,7	3,3	5,5
Methionin	0,9	2,1	0,9	2,0	1,2	2,0
Isoleucin	1,9	4,2	1,8	4,0	2,5	4,1
Leucin	4,5	10,1	4,6	10,0	5,4	9,1
Tyrosin	1,5	3,4	1,6	3,4	2,2	3,7
Phenylalanin	2,7	6,1	2,6	5,6	3,6	6,1
Ornithin	--		0,1	0,2	0,1	0,1
γ-Aminobuttersäure	--		--		--	
Lysin	2,6	5,9	2,8	6,0	4,2	7,1
Histidin	0,9	2,0	0,9	2,0	1,5	2,5
Arginin	2,9	6,5	4,1	8,9	4,6	7,7
Phosphoserin	--		--		--	
Phosphoethanolamin	0,4	0,9	--		--	
Taurin	0,4	1,0	0,2	0,3	--	
Hydroxy-Prolin	--		--		--	
α-Aminoadipinsäure	--		--		--	
Citrullin	--		--		--	
α-Aminobuttersäure	--		--		--	
Cystin	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4
Cystathionin	--		--		--	
β-Alanin	--		--		--	
β-Aminobuttersäure	--		--		--	
1-Methylhistidin	--		--		--	
3-Methylhistidin	--		--		--	
Carnosin	--		--		--	
Hydroxy-Lysin	--		--		--	
∑ AS	44,5	100	45,9	100	59,3	100

4.1.3 Nährstoffzusammensetzung

Der Phosphorgehalt ist ein wichtiges Futteralgenqualitätsmerkmal, deshalb wurde er neben der biochemischen Zusammensetzung der Algen in dieser Arbeit berücksichtigt. Der Stickstoffgehalt wurde auch als wichtiger Nährstoff der Algen bestimmt. Der vergleichende Nährstoffgehalt der Algen zeigte einen höheren Phosphoranteil in der Alge *D. armatus*. So besitzt *D. armatus* 3,3-mal mehr Phosphor als die Alge *P. subcapitata* und 5-mal mehr als die Alge *M. minutum*. Bezüglich des Stickstoffs (N) unterschieden sich die drei Algen nicht deutlich voneinander (Tabelle 44).

Tabelle 44: Nährstoffgehalt der Futteralgen (%: bedeutet: Gramm Nährstoff auf 100 Gramm Algentrockengewicht)

Die Algen	C%	N%	P%
Pseudokirchneriella subcapitata	42	6,7	0,06
Monoraphidium minutum	49,3	6,8	0,04
Desmodesmus armatus	49	7,7	0,2

Die in der *batch*-Kultur unter selben Bedingungen kultivierten und in der exponentiellen Wachstumsphase geernteten Algen wiesen unterschiedliche Verhältnisse der Nährstoffe auf (Tabelle 45).

Tabelle 45: Nährstoffverhältnisse in Futteralgen

Die Algen	C:P	C:N	N:P
Pseudokirchneriella subcapitata	1885:1	8:1	379:1
Monoraphidium minutum	3191:1	7:1	259:1
Desmodesmus armatus	708:1	7:1	95:1

Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Phosphor (C:P) wies den niedrigsten Wert (708:1) in der Alge *D. armatus* auf. In der Alge *M. minutum* war es besonders hoch (3191:1). In der Alge *P. subcapitata* war das Verhältnis C:P relativ hoch 1885:1. Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff zeigte geringe Unterschiede in den drei Algen.

4.2 Effekte der Futteralgenqualitäten

In der vorgestellten Arbeit stand der Einfluss verschiedener Futteralgenqualitäten (*Pseudokirchneriella subcapitata, Monoraphidium minutum* und *Desmodesmus armatus*) auf die Lebensparameter (hauptsachlich: Lebensspanne und Reproduktion) von vier Wasserfloh-Arten (*Daphnia magna*, *Daphnia galeata*, *Moina macrocopa* und *Moina micrura*) im Mittelpunkt des Interesses.

Struktur und Dynamik planktischer Zönosen sind in hohem Maße von top-down- und bottom-up-Steuerung reguliert (Lampert & Sommer 2007)[22]. Ein bottom-up Faktor, der die Entwicklung des Zooplanktons (hier auf Cladoceren konzentriert) besonders stark beeinflusst, ist die Futterqualität. Als nicht selektive Filtrierer haben Cladoceren ein breites Nahrungsspektrum, so dass verschiedene Parameter für die Beurteilung der Futteralgenqualität geeignet sind. Die Ingestierbarkeit von Cladoceren kann durch die **Form**, die **Größe** oder durch **Verteidigungsstrukturen** der Futteralgen herabgesetzt sein. Außer Unterschieden in der Ingestierbarkeit hängt die Effizienz, mit der die Cladoceren wachsen und sich reproduzieren kaönnen, von der **Verdaubarkeit** der Nahrung ab. Die anderen bestimmenden Futteralgenqualitätsaspekte sind zwei Faktoren: die **mineralische** (vor allem Phosphor) und die **biochemische** (vor allem Fettsäuren und Aminosäuren) Komponenten der filtrierten Futteralgen.

In den nächsten Abschnitten wird untersucht, ob die Lebensspanne und die Reproduktion der untersuchten Cladoceren durch die Futteralgenqualität limitiert waren und ob qualitative Faktoren der Futteralgen eine deutliche bzw. entscheidende Rolle auf diesen Cladoceren unter chemischen Stress ausgelöst durch HuminFeed® spielten. Darüber hinaus wird der Bedarf der Versuchstiere insbesondere an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (**p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cids PUFA), an Aminosäuren und Phosphor kritisch beleuchtet. Um die Effekte der Futteralgenqualität auf die Lebensparameter jeder Art der hier untersuchten Cladoceren vergleichen zu können, wurden die Daten der Kontrollen der

[22] **bottom-up control**: regulation of structure and dynamics of a community by the amount of resources.
top-down control: control of the structure and dynamics of a community by predators, i.e., control from the highest to the lowest trophic levels (Lampert & Sommer 2007).

nacheinander durchgeführten HuminFeed®-Versuche bei den verschiedenen Futteralgenqualitäten (mit dieser Art) verwendet. Auf Grund des geplanten experimentellen Arbeitsablaufes war es nicht möglich, Ansätze bei verschieden Futteralgen simultan in einem Versuch zu untersuchen.

4.2.1 *Daphnia magna*

4.2.1.1 Ergebnisse

Die vergleichende Darstellung der Lebensspanne von *D. magna* in Abhängigkeit von verschiedenen Futteralgenqualitäten in Abbildung 44 zeigt, dass die längste mittlere und mediane Lebensspanne bei *D. armatus* aufgetreten ist. Diese Daten unterschieden sich nur von *P. subcapitata* signifikant ($p < 0,05$*; Log Rank Test). *P. subcapitata* und *M. minutum* erreichten keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$; Log Rank Test).

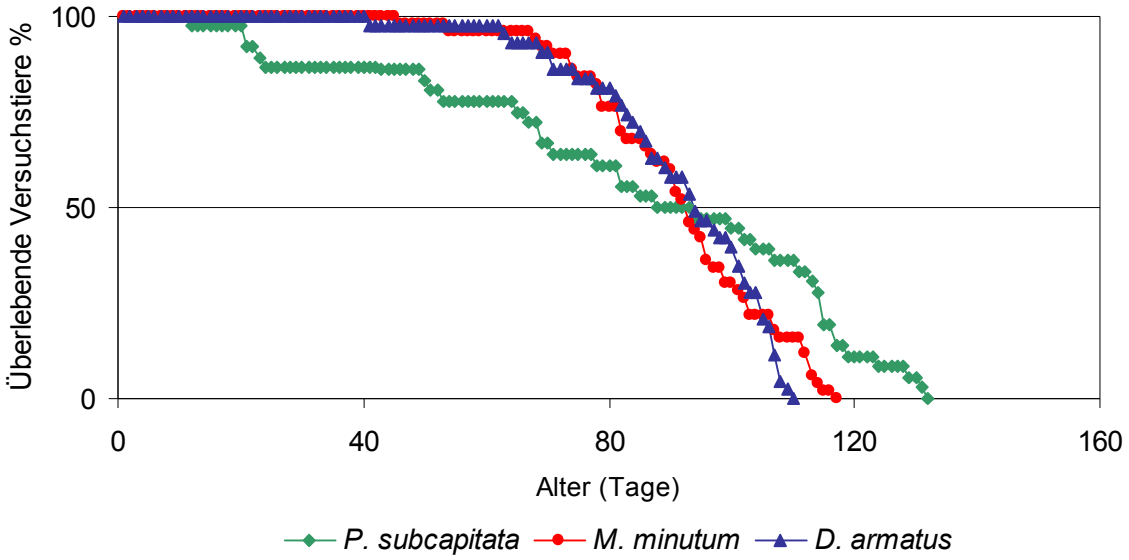

Abbildung 44: Lebensdauertest von *D. magna* in Abhängigkeit von verschiedenen Futteralgen. Die Datenpunkte auf *P. subcapitata* sind von (Bouchnak 2009) erhoben.

D. magna lebte mit *P. subcapitata* am längsten (131 Tage). Die maximale Lebensspanne ist jedoch aufgrund ihrer Beschränkung auf ein einzelnes Versuchstier für sich allein stehend nicht besonders aussagekräftig. Eine Übersicht der untersuchten Lebensspanneparameter (mediane, durchschnittliche und maximale Lebensspanne) ist in der Tabelle 46 dargestellt.

Tabelle 46: Lebensdauertest von *D. magna* in Abhängigkeit von Futteralgenqualität. Der Unterschied zwischen den Algen ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant; ns: nicht signifikant. Die Lebensspannedaten auf *P. subcapitata* wurden von (Bouchnak 2009) erhoben.

Futteralgen	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit	
				Vergleich	p-Wert
P. subcapitata (PS)	93	85,3	131	PS vs. MM	= 0,06 ns
M. minutum (MM)	92,3	91,6	116	MM vs. DA	= 0,44 ns
D. armatus (DA)	93,7	91,7	109	PS vs. DA	< 0,05*

Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife von *D. magna* wurde durch die Algenqualität hoch signifikant beeinflusst (p < 0,01**; ANOVA on Ranks), da die Nachkommen der Versuchstiere der zehn Replikaten bei Fütterung mit *M. minutum* ihre früher (am 10. Versuchstag) geschlüpft sind als mit *P. subcapitata* bzw. *D. armatus* (erst am 11. Versuchstag). Die Zeit zwischen zwei Bruten wurde dagegen durch die Algenqualität nicht beeinflusst. Die Effekte der drei Futterqualitäten auf die Reproduktion unterschieden sich wesentlich voneinander (Abbildung 45).

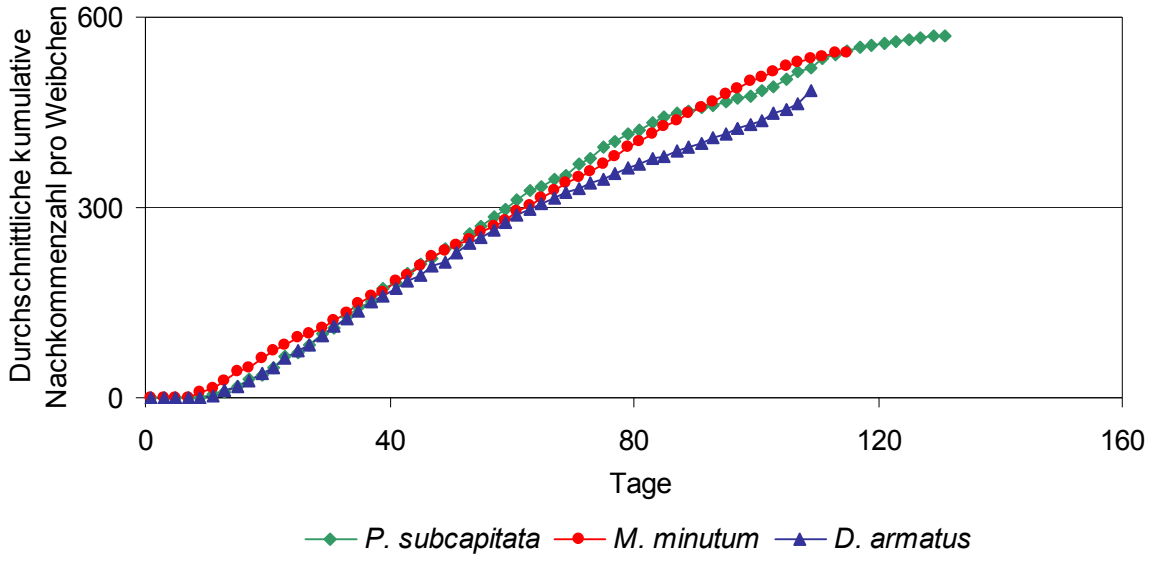

Abbildung 45: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Reproduktionstests von *D. magna* bei verschiedenen Futteralgen. Die Datenpunkte auf *P. subcapitata* wurden von (Bouchnak 2009) erhoben.

Die durchschnittliche kumulative Nachkommenkurve ergab 569 Nachkommen pro Weibchen im Ansatz mit der Futteralge *P. subcapitata* und 543 Nachkommen pro Weibchen im Ansatz mit der Futteralge *M. minutum*, was keinen signifikanten

Unterschied darstellt (p > 0,05; T-Test). Die geringste kumulative Nachkommenzahl mit 483,6 Nachkommen pro Weibchen wurde bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* festgestellt (Tabelle 47). So verursachte die Qualität der Alge *D. armatus* eine hoch signifikante bzw. höchst signifikante Verringerung der Reproduktionsleistung von *D. magna* im Vergleich zur den Algen *M. minutum* bzw. *P. subcapitata*.

Tabelle 47: Ergebnisse des Reproduktionstests von *D. magna* in Abhängigkeit von Futteralgenqualität. Der Unterschied zwischen den Algen ist auf dem Niveau (p < 0,01**) hoch signifikant und (p < 0,001***) höchst signifikant, ns: nicht signifikant. Die Reproduktionsdaten auf *P. subcapitata* wurden von (Bouchnak 2009) erhoben.

Futteralge	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit	
		Vergleich	p-Wert
P. subcapitata (PS)	569	PS vs. MM	= 0,06 ns
M. minutum (MM)	543	MM vs. DA	< 0,01 **
D. armatus (DA)	483,6	PS vs. DA	< 0,001 ***

Korrelationen zu Futterqualitäten

Bezüglich der durchschnittlichen Lebensspannen von *D. magna* bei Fütterung mit verschiedenen Algen und den unterschiedlichen Fütterqualitätsfaktoren der Algen wurden zunächst einfache Korrelationen berechnet (Pearson-Korrelation), um eine allgemeine Übersicht zu erhalten. Die durchschnittlichen Lebensspannen von *D. magna* bei verschieden Futteralgenqualitäten korrelierten negativ, aber höchst signifikant mit dem gesamten Fettsäurengehalt sowie mit dem Gehalt an α-Linolensäure, gefolgt von der Aminosäure Arginin mit R = 0,96, was eine signifikante positive Korrelation darstellte.

Für den gesamten Gehalt an Aminosäuren bzw. Histidin ergaben sich relativ gute, aber nicht signifikante Korrelationen. Die statistische Analyse ist in Tabelle 48 zu erkennen.

Tabelle 48: Korrelationskoeffizient (R) und Signifikanzniveaus (p) einfacher Korrelation zwischen den durchschnittlichen Lebensspannen von *D. magna* und verschiedenen Qualitätsfaktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und p < 0,001*** höchst signifikant; ns: nicht signifikant.

Qualitätsfaktor	R	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
Σ Fettsäuren	-1	< 0,001***
α-Linolensäure %	-1	< 0,001***
Σ Aminosäuren	0,58	= 0,4 ns
Arginin	0,96	< 0,05*
Histidin	0,53	= 0,5 ns
C:N	0,49	= 0,5 ns
N%	0,59	= 0,4 ns
C:P	0,02	= 0,9 ns
P%	0,39	= 0,6 ns

Hinsichtlich der Beeinflussung der Lebensspanne durch das C:P Verhältnis bzw. den Gehalt an P% (g/ 100 g) in den Futteralgen war eine eher schwache Korrelation zu verzeichnen, die keinen signifikanten Wert erreichte (R = 0,02 bzw. 0,39; p = 0,9 bzw. 0,6; Pearson-Korrelation). Dagegen war die Abhängigkeit von C:N bzw. vom Stickstoffgehalt (N%) mit einem Korrelationskoeffizient von R = 0,5 bzw. 0,6 relativ deutlich (Tabelle 48).

Mit multipler Korrelation soll der Zusammenhang zwischen mehreren Prädiktorvariablen und einer Kriteriumsvariablen geklärt werden. Die multiple Regression dient dazu, eine Gleichung zur Vorhersage einer Kriteriumsvariablen aufgrund mehrerer Prädiktorvariablen zu bestimmen (siehe z. B. Windemuth et al. 1992).

Die bei Fütterung mit den drei Algen gewonnenen durchschnittlichen Lebensspannen (Ø LS) wurden mit den verschiedenen Qualitätsfaktoren in Zusammenhang gesetzt, um die vorausgesetzte durchschnittliche Lebensspanne von *D. magna* vorherzusagen. Die Einflussgröße C:P sowie P% wurde bei der multiplen Korrelationsanalyse ausgeschlossen, da der Zusammenhang nicht signifikant war und der Korrelationskoeffizient (R) relativ klein war (Tabelle 48). Diese schwache Korrelation lässt sich anhand des großen Unterschieds des Phosphorgehalts der drei Algen erklären (Tabelle 44). Wurden die Daten der bereits festgestellten Lebensspannen (Ø LS) von *D. magna* bei der Fütterung mit unterschiedlichen Algen zusammengefasst und in multiplen Korrelationen mit den verschiedenen Qualitätsfaktoren gebracht, wurden die multiple Korrelation mit der

α-Linolensäure (1.Formel) und mit gesamtem Fettsäurengehalt (2.Formel) am wahrscheinlichsten gepasst[23].

1. Formel:

Ø LS = 18,4 + (8,7 * Arginin%) + (23,2*α-Linolensäure%) + (4,7 * C:N)

2. Formel:

Ø LS = 17,7 + (8,8 * Arginin%) + (12,3 * Σ Fettsäuren%) + (4,7 * C:N)

Im Reproduktionstest ergab sich die beste positive Korrelation für den gesamten Fettsäurengehalt sowie für die α-Linolensäure mit R = 0,97; p < 0,05* (Pearson-Korrelation). Arginin korrelierte höchst signifikant, aber negativ mit dem Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut (R = -1; p < 0,001***; Pearson-Korrelation). Für den gesamten Gehalt an Aminosäuren bzw. Histidin sowie Stickstoff (N%) ergaben sich relativ gute negative, aber nicht signifikante Korrelationen. Für Phosphor ergaben sich nur schwache nicht signifikante Korrelationen. Die statistische Analyse ist in Tabelle 49 zu erkennen.

Tabelle 49: Korrelationskoeffizient (R) und Signifikanzniveaus (p) einfacher Korrelation zwischen dem Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut (bei *D. magna*) und verschiedenen Qualitätsfaktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und p < 0,001*** höchst signifikant; ns: nicht signifikant.

Qualitätsfaktor	R	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
Σ Fettsäuren	0,97	< 0,05*
α-Linolensäure %	0,97	< 0,05*
Σ Aminosäuren	-0,72	= 0,28 ns
Arginin	-1	< 0,001***
Histidin	-0,68	= 0,32 ns
C:N	-0,32	= 0,7 ns
N%	-0,73	= 0,3 ns
C:P	0,17	= 0,8 ns
P%	-0,56	= 0,4 ns

[23] Hinsichtlich der Formeln: (%): g/100 g Algenbiomasse (für α-Linolensäure und Fettsäure) oder Algentrockenmasse (für Arginin)

4.2.1.2 Diskussion

D. magna konnte bei allen Futteralgenqualitäten wachsen und sich reproduzieren. Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife war auf *D. armatus* signifikant kürzer als auf *P. subcapitata* bzw. *M minutum*. Die Zeit zwischen zwei Bruten wurde durch die Futteralgenqualität nicht beeinflusst.

Im Durchschnitt und im Median lebte *D. magna* am längsten bei Fütterung mit *D. armatus*. Allerdings war der Unterschied nur mit *P. subcapitata* signifikant ($p < 0,05$*; Log Rank Test). *D. magna* lebte bei Fütterung mit *M. minutum* länger als mit *P. subcapitata*. Signifikante Unterschiede sind jedoch nicht ermittelbar (Tabelle 46).

Biochemische Analysen der drei Algen zeigten, dass *P. subcapitata* mit dem größten Gehalt an Fettsäuren (im Allgemeinen) und an α-Linolensäure (im Speziellen) die beste Futterqualität besaß, gefolgt von *D. armatus* und dann *M. minutum*. Im Gegensatz dazu waren *D. armatus* und *M. minutum* reicher an Aminosäuren (im Allgemeinen) und an Arginin (im Speziellen) als *P. subcapitata*.

Benutzt man die ermittelten multiplen Korrelationsgleichungen, so könnte die vorausgesetzte durchschnittliche Lebensspanne von *D. magna* vorhergesagt werden. Würden die Futteralgen weiterer Studien analysiert und die Gehalte an einzeln Aminosäuren (insbesondere Arginin), an einzelnen Fettsäuren (insbesondere die dreifach ungesättigte α-Linolensäure) und an Nährstoffen (CNP) bestimmt, könnte man mit den hier entwickelten Formeln abschätzen, wie lange *D. magna* im Durchschnitt bei Fütterung mit der analysierten Alge leben würde.

Darüber, ob Arginin bzw. α-Linolensäure **allein** die Ursache oder lediglich ein Indikator für die Futterqualität der Futteralge ist, geben die **multiplen korrelativen** Ergebnisse jedoch keinen Aufschluss. Daher ist anzunehmen, dass die α-Linolensäure bzw. der gesamte Fettsäuregehalt sowie Arginin eine große **Vorhersagekraft** für die Futterqualität der Alge besitzt. So sind eigentlich mehrere Futterqualitätsfaktoren in der Lage, die Ø LS von *D. magna* vorherzusagen (Formeln 1 und 2).

Die beiden am wahrscheinlichsten entwickelten Formeln scheinen **realistisch** zu sein. Bei Nullressourcenkonzentrationen (alle Futterqualitätsfaktoren = 0) wäre die vorausgesetzte durchschnittliche Lebensspanne 18,4 anhand der 1. Formel bzw. 17,7 anhand der 2. Formel. Dies stimmt gut mit den Daten zusätzlicher Versuche überein, in denen *D magna* bis 14 Tagen ohne Futter leben konnte (Bouchnak, unveröffentlichten Daten).

Die vergleichende Darstellung der Futterqualitätseffekte auf die Reproduktionsleistung von *D. magna* zeigte, dass die höchste durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* erzielt wurde.

Die Messgrößen der Futterqualität wurden mit der Reproduktionsleistung, gemessen als Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut, korreliert, um die Vorhersagekraft der Messgrößen für die Reproduktion abschätzen zu können. die **beste positive Korrelation** ergab sich im Reproduktionstest für den **Gesamtfettsäurengehalt** sowie für die **α-Linolensäure** mit $R = 0{,}97$; $p < 0{,}05$* (Pearson- Korrelation).

Verschiedene auf Korrelationsanalysen basierende Studien vermitteln die Ansicht, dass Daphnien einen substanziellen Bedarf an α-Linolensäure haben (z. B. Müller-Navarra 1995a) und diese Fettsäure daher für Daphnien als essenziell angesehen werden muss (Goulden et al. 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen Studien überein, da sich die beste Korrelation der Reproduktionsleistung von *D. magna* mit der dreifach ungesättigten α-Linolensäure bzw. dem gesamten Gehalt an Fettsäuren mit $R = 0{,}99$ ergab (Tabelle K). Müller-Navarra (1995b) fand ebenfalls, dass das Wachstum von *Daphnia galeata* bei der Verfütterung der phosphorlimitierten Alge *Cyclotella meneghiniana*, die aber viele hoch ungesättigte Fettsäuren enthielt, besser war als bei der Verfütterung der phosphorgesättigten Alge *Scenedesmus acutus*, die kaum hoch ungesättigte Fettsäuren enthielt. Somit scheinen mehrfach ungesättigte Fettsäuren für die Futterqualität der Algen von Bedeutung zu sein. Dies konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nur für die Reproduktion aber nicht für die Lebensspanne festgestellt werden

Koch (2009) hat nachgewiesen, dass Arginin einen Effekt auf den Reproduktionsmodus von ***Daphnia pulex*** hat. So fördert Arginin die Neonaten-Produktion und unterdrückt die von Ephippien. Anders als bei Koch (2009) wurde bei den gegenwärtigen Versuchen festgestellt, dass die Aminosäure **Arginin** höchst signifikant aber **negativ** mit dem Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut korrelierte ($R = -1$; $p < 0{,}001$***; Pearson-Korrelation). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Koch (2009) und denen der vorliegenden Arbeit lässt sich sicherlich auf die unterschiedlichen Taxa von *Daphnia* und die unterschiedlichen Lifetrait-Variablen zurückführen, da unterschiedliche *Daphnia*- Arten unterschiedlich von Futterqualität beeinflusst werden können (Gulati & DeMott 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Arginin für die Langlebigkeit von *D. magna* verantwortlich zu sein scheint, da sich die beste positive Korrelation für Arginin ergab. Die Fettsäuren (im Allgemeinen) und α-Linolensäure (im Speziellen) sind für die Fruchtbarkeit von *D. magna* verantwortlich. Daher ist anzunehmen, dass sich unterschiedliche Futterqualitäten signifikant unterschiedlich auf Lebensparameter von *D. magna* auswirken. Wie stark der Einfluss der Futterqualität im Vergleich zu anderen Umweltfaktoren ist, die ebenfalls lokale Akklimatisierung von Daphnien beeinflussen (z.B. Temperatur, Fraßdruck usw.), bleibt in weiteren Studien zu überprüfen.

In allen mit *D. magna* durchgeführten Versuchen bei verschiedenen Futteralgenqualitäten wirkte sich HuminFeed® stets positiv auf Lebensspanne und negativ auf die Reproduktion aus. So wurde festgestellt, dass die Wirkungsweise des chemischen Stresses ausgelöst durch HuminFeed® auf *D. magna* von der Futteralgenqualität nicht beeinflusst wurde. Ob sich die Futterqualität gegen andere Umwelttressoren (z. B Schwermetalle) durchsetzen könnte, bleibt in weiteren Studien zu erklären.

Ehippien-Produktion

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass *D. magna* Ephippien in Abwesenheit von Männchen produzieren kann. Die diskutierbaren möglichen Gründe der Ephippien-Produktion in *D. magna* sind (1) Dichtstress, (2)

Exposition gegenüber einem natürlichen Xenobiotikum (HuminFeed®) und (3) Futteralgenqualität.

D. magna produzierte in einer Populationsdichte von 5 Versuchstieren pro 100 ml bei Fütterung mit *P. subcapitata* weder im Kontrollansatz noch in Ansätzen mit HuminFeed® Ephippien (Bouchnak & Steinberg 2010). Vielmehr traten weder beim zusätzlichen Versuch mit einer Populationsdichte von 10 Versuchstiere pro 100 ml weder in Kontrollansatz noch in Ansätzen mit HuminFeed® Ephippien auf, wenn die Versuchstiere mit *P. subcapitata* gefüttert wurden (Bouchnak, unveröffentlichte Daten). Bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* konnte in einer Populationsdichte von 5 Versuchstieren pro 100 ml nur eine geringe Ephippien-Produktion im Ansatz mit 1,43 mM DOC nachgewiesen werden. Wurde *D. magna* mit der Alge *D. armatus* gefüttert, so produzierten die Versuchstiere in allen exponierten Ansätzen Ephippien. Daher konnten die direkte Effekte der Populationsdichte und die Exposition gegenüber HuminFeed® als Gründe der Ephippien-Produktion ausgeschlossen werden. So bleibt allein die Futteralgenqualität übrig. Betrachtet man die Zusammensetzung der drei Futteralgen, so fällt auf, dass *P. subcapitata* die an Fettsäuren reichste Alge war, während *D. armatus* die an Phosphor und an Aminosäuren (sowohl in Bezug auf den gesamten Gehalt an Aminosäuren als auch in Bezug auf den prozentuellen Anteil einzelner Aminosäuren) reichste Alge war (siehe Tabelle 43).

Koch (2009) hat nachgewiesen, dass die Investition in Dauerstadien und die zeitliche Optimierung des Wechsels zwischen den **Reproduktionsmodus** (parthenogenetisch oder sexuelle Reproduktion) bei *Daphnia pulex* ein wichtiger Fitnessfaktor ist, der von der Futterqualität abhängig ist und durch die Präsenz von einzelnen **Aminosäuren gesteuert** werden kann. So unterdrücken die Verfügbarkeit einzelner potentiell essentieller Aminosäuren, insbesondere **Arginin**, die durch Populationsdichte induzierte Dauerstadienproduktion, und **kontrollieren** den Wechsel zwischen den Reproduktionsmodi**.**

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Futteralge *D. aramtus* die an Arginin reichste Alge. Warum produzierte *D. magna* nur bei Fütterung mit dieser Alge Ephippien, während bei Fütterung mit *P. subcapitata* keine und mit *M. minutum* kaum

Ephippien produziert wurden? Das deutet darauf hin, dass sich multiple Stressfaktoren, denen die Versuchstiere ausgesetzt wurden, nicht nur **additiv** sondern auch **synergistisch** auf *D. magna* auswirkten und die Produktion der Ephippien als eine Stress-Reaktion induzierten.

In verschiedenen Versuchen mit *D. magna* wurde ermittelt, dass ab einer bestimmten Populationsdichte der sogenannte Dichtestress auf die Populationstiere wirkt (Koch 2009; Pietrzak et al. 2010). So hat Koch (2009) nachgewiesen, dass eine Populationsdichte von 35-50 Individuen einen Dichtestress induziert. Dieser **Dichtestress** könnte hier auf die Versuchstiere **zusammen** mit der **suboptimalen Futteralge**, gemessen an Fettsäuren (insbesondere PUFA) aber nicht Aminosäuren, und dem chemischen Stress ausgelöst durch **HuminFeed® additiv bzw. synergistisch** gewirkt haben, da hier 5 Versuchstiere in 100 ml Medium gehalten wurden. Die dadurch induzierte Stress-Reaktion könnte unter anderem durch die Produktion der Ehippien deutlich werden.

Ob sich die Qualität der hier als suboptimal beschrieben Futteralge *D. armatus* durch eine Supplementierung mit der potentiell essentiellen Fettsäure α-Linolensäure verbesserte und die Produktion der Ehippien unterdrückte, bleibt in weiteren Studien zu überprüfen

4.2.2 *Daphnia galeata*

4.2.2.1 Ergebnisse

Da die Versuche von *D. galeata* bei Fütterung mit *M. minutum* bzw. mit *D. aramtus* erfolglos waren (siehe 3.2.2 und 3.2.3) ist hier keine vergleichende Darstellung sowohl der Lebensparameter als auch der Reproduktion von *D. galeata* in Abhängigkeit von verschiedenen Futteralgenqualitäten möglich. Bei Fütterung mit *P. subcapitata* lebte *D. galeata* im Durchschnitt 40 Tage, im Median ca. 52 Tage und im Maximal 68 Tage. Ab dem 8. Lebenstag konnte D. galeata ihre erste Brut entlassen. Dann hat sie sich alle zwei Tage mit ca. 13 Nachkommen pro Brut reproduziert.

4.2.2.2 Diskussion

Daphnien sind unselektive filtrierende Zooplankter. Wichtige Merkmale der Filtermorphologie sind zum einen die Filterfläche, die die Größe des Filters und damit die Menge des gefilterten Wasservolumens bestimmt und zum anderen die Maschenweite der Filter (Intersetulae), durch die die Größe der abfiltrierbaren Partikel determiniert wird (Geller & Müller 1981). Im vorliegenden Versuch konnten die adulten Wasserflöhe der Art *D. galeata,* die von einer mit der Alge *P. subcapitata* gefütterten Stammkultur entnommen wurden, die Futteralge *D. armatus* fressen. Darüber hinaus konnten adulte *D. galeata* auf *D. armatus* wachsen aber **nur wenige N**ach**k**ommen (ca. 2 NK pro Weibchen und Brut) **reproduzieren**. Dagegen konnte die neugeborenen *D. galeata* **nicht gut** auf *D. armatus* wachsen. Sie sind nach wenigen Tagen (maximal 4 Tage) gestorben. Daher wäre anzunehmen, dass die Maschenweite der Filter (Intersetulae) in den neugeborenen *D. galeata* kleiner sein könnte als in den adulten Tieren. Als Folge konnten die neugeborenen *D. galeata* die Futteralge *D. armatus* nicht fressen. Möglicherweise konnten die Neugeborenen die mütterlich mitgegebenen Reserven für das Überleben (jedoch nur wenigen Tagen) nutzen. Es könnte auch sein, dass *D. galeata* aufgrund der Algenform die Alge *D. armatus* nicht fressen kann. Die Ingestierbarkeit und die Verdaubarkeit bei *D. galeata* können durch die Form, die Größe oder durch Verteidigungsstrukturen der Futteralgen herabgesetzt sein (Vanni & Lampert 1992). So sind **kolonienbildende Algen weniger geeignet** als rundliche, einzellige Algen, **besonders für Juvenile**. Zum Beispiel

haben Knisely & Geller 1986 nachgewiesen, dass die **kolonienbildende** Kieselalgen *Asterionella formosa* und *Fragilaria crotonensis* als Futter für *D. galeata* wenig geeignet sind. Auch wenn die Alge *D. aramtus* im Ultraschall zerstört wurde, wurde sie von *D. galeata* nicht gefressen bzw. nicht gut verdaut. *D. armatus* könnte durch besondere **Zellwandstrukturen bzw. –eigenschaften** eine geringere Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit erreichen. Daher ist es denkbar, dass die neugeborenen *D. galeata* durch die reduzierte Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit der Alge *D. armatus* betroffen waren. Es lässt sich jedoch in weiteren Studien ermitteln.

Potentielle Limitationen des Wachstums bzw. der Reproduktion der Daphnien durch **Phosphor** oder andere Futterinhaltsstoffe (z. B. **Fettsäure**) müssen sich nicht gegenseitig ausschließen. So ist es durchaus möglich, dass bei der Überschreitung eines Schwellenwertes des C:P-Verhältnisses des Futters das Wachstum der Daphnien durch Phosphor, unterhalb der Schwelle aber **durch andere** Futterinhaltsstoffe (Sundbom & Vrede 1997) limitiert ist. Die Limitation des Wachstums und der Reproduktion von *D. galeata* durch den Phosphorgehalt der Alge *D. armatus* erscheint **unwahrscheinlich**, denn diese Alge hat einen relativ hohen Phosphorgehalt und das C:P-Verhältnis war mit 708:1 unter dem in einigen Literatur nachgewiesenen Schwellenwert 2266 (Sterner et al. 1993). Die Beeinflussung der Nahrungsqualität durch den Phosphorgehalt und durch die Fettsäuren steht in einem engen Zusammenhang: Mit zunehmendem Phosphorgehalt der Nahrung (Qualitätssteigerung) nimmt die Bedeutung des Fettsäuregehalts zu und **umgekehrt** (Gulati & DeMott 1997; Sundbom & Vrede 1997). Hinsichtlich des Fettsäuregehaltes ist die Angabe einer Schwellenkonzentration schwieriger, da es sich um einen Summenparameter handelt. Sundbom & Vrede (1997) wiesen darauf hin, dass qualitativ hochwertige Futteralgen für Daphnien einen hohen Fettsäuregehalt besitzen. So dass die Fettsäure eine hohe Bedeutung für die Reproduktion und das Wachstum von *D. galeata* besitzt, da die nicht-phosphorlimitierte Alge *Scenedesmus quadricauda* mit einer Supplementierung der Fischöl oder Eicosapentaensäure EPA (20:5n-3) eine qualitativ gute Nahrung für *D. galeata* darstellte. Allerdings können auch andere Fettsäuren, wie beispielsweise die α-Linolensäure (von Elert 2002) gute Nahrungsqualitäten für die Cladocere *Daphnia galeata* bieten. Die untersuchte

Futteralge *D. armatus* enthielt nur 0,7 mg Fettsäure pro g Algenbiomasse. In dieser Alge waren die EPA nicht detektiert. Es bleibt daher fraglich, ob die suboptimale Qualität der Futteralge *D. armatus* durch den Fettsäuregehalt hervorrufen würde und *D. galeata* sich aufgrund des geringen Fettsäuregehaltes in dieser Futteralge nicht oder kaum reproduzieren hätte.

Die Alge *P. subcapitata* stellt eine gute (**optimale**) Futterqualität für *D. galeata* dar, denn die Versuchstiere konnten auf dieser Alge gut wachsen und sich reproduzieren. Neben dem qualitativen Nährwert der Futterpartikel spielt auch deren Fressbarkeit eine Rolle für die Daphnien, da diese nur Partikel in einem bestimmten Größenspektrum ingestieren können. Die biochemische Untersuchung hat gezeigt, dass in der Alge *P. subcapitata* eine Vielzahl verschiedener Fettsäuren vorhanden ist, zu denen auch die für Daphnien möglicherweise **essenziellen Fettsäuren** gehören. Außerdem ist diese Alge relativ reich an **Phosphor** und an Aminosäuren und kommt als einfach fressbare **Einzelzelle** vor.

D. armatus ist die an Aminosäuren (im Allgemeinen) und an Arginin bzw. Histidin (im Speziellen) reichste Alge. Die beiden Algen *P. subcapitata* und *M. minutum* unterschieden sich im gesamten Gehalt an Aminsäuren kaum voneinander. Im Gegensatz dazu unterschieden sie sich im Gehalt an einzelnen Aminosäuren (hauptsachlich Arginin). Hätte der Versuch bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* fortgesetzt werden können und hätte nicht wegen des vermutlichen Parasitenbefalls abgebrochen werden müssen, so hätte evt. geklärt werden können, wie *D. galeata* von Futteralgenqualität durch Aminosäuren (im Allgemeinen) und **Arginin** (im Speziellen) beeinflusst würde. Es ist in weiteren Studien zu überprüfen.

4.2.3 *Moina macrocopa*

4.2.3.1 Ergebnisse

Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Lebensdauertests von *M. macrocopa* bei verschiedenen Futteralgenqualitäten in Abbildung 46 zeigt, dass die Futteralgenqualitäten auf das Überleben der Versuchstiere höchst signifikant auswirken (p < 0,001***; Log Rank Test).

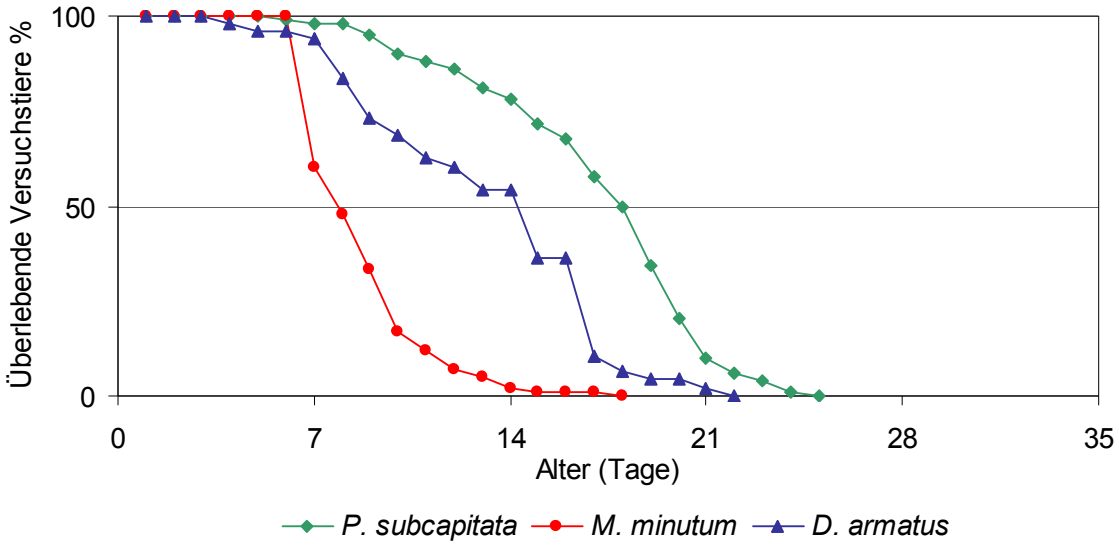

Abbildung 46: vergleichende Darstellung des Lebensdauertests von *M. macrocopa* bei verschiedenen Futteralgen. Die Effekte der Algenqualitäten unterschieden sich höchst signifikant (p < 0,001***) voneinander (siehe Tabelle 50).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere in den einzelnen Futteralgen war unterschiedlich. Es zeigte sich deutlich, dass die Versuchstiere viel besser bei Fütterung mit *P. subcapitata* überlebten als mit *M. minutum und D. armatus*. Außerdem stieg die Überlebenschance bei Fütterung mit *D. armatus* im Vergleich zu *M. minutum*. Die durchschnittliche Lebensdauer von *M. macrocopa* betrug 17,4 Tage bei den mit *P. subcapitata* gefütterten Versuchstieren, während bei Fütterung mit *M. minutum* nur 8,9 Tage betrug, was eine Verringerung der durchschnittlichen Lebensdauer um ca. 52% bedeute. Bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* lagen die Versuchstiere mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 13,3 Tagen zwischen den beiden anderen Algenansätzen (Tabelle 50). Es zeigt sich sowohl eine Erhöhung der maximalen Lebensdauer als auch der medianen Lebensdauer im Ansatz mit der Futteralge *P. subcapitata* im Verhältnis zu

denanderen Futteralgen, was die Überlebenskurve und die zusammenfassende statistische Analyse erkennen lassen (Abbildung 46, Tabelle 50).

Tabelle 50: Statistische Analyse des Lebensdauertests von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von Futteralgenqualität. Der Unterschied zwischen den Algen ist auf dem Niveau (p < 0,001***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte bei Fütterung mit den Algen PS und MM sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Futteralgen	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit	
				Vergleich	p-Wert
P. subcapitata (PS)	17,5	17,4	23,5	PS vs. MM	< 0,001 ***
M. minutum (MM)	7,8	8,9	15,5	MM vs. DA	< 0,001 ***
D. armatus (DA)	14,2	13,3	20	PS vs. DA	< 0,001 ***

Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife von *M. macrocopa* und die Zeit zwischen zwei Bruten waren durch die Algenqualität nicht beeinflusst. Die Effekte der drei Futterqualitäten auf die Reproduktion unterschieden sich jedoch höchst signifikant voneinander (p < 0,001***; T-Test). Der Einfluss verschiedener Futteralgen auf die Reproduktion von *M. macrocopa* ist in der nachstehenden Abbildung 47 zu erkennen.

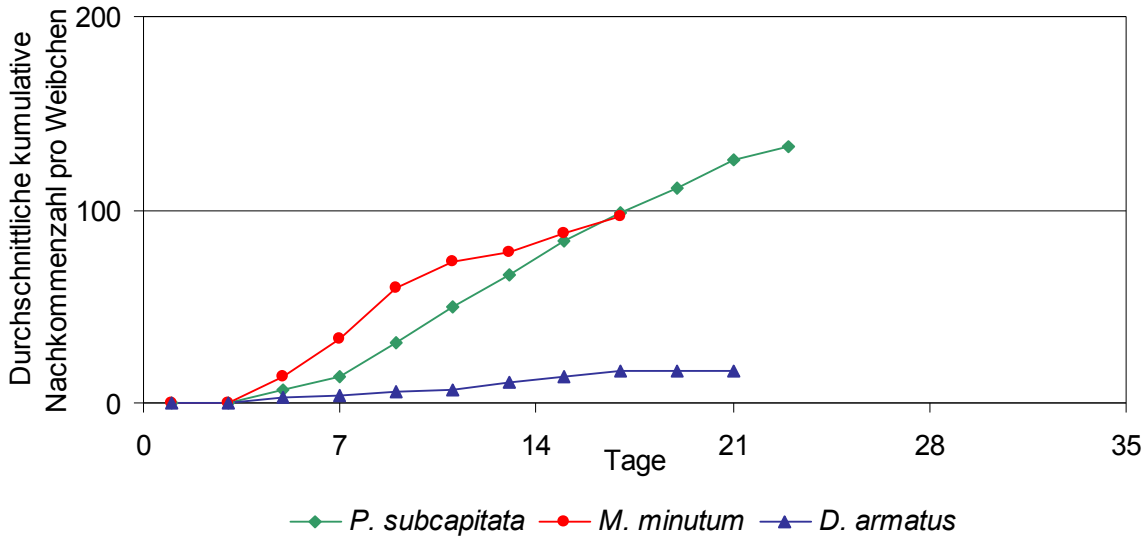

Abbildung 47: vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Reproduktionstests von *M. macrocopa* bei verschiedenen Futteralgen. Die Effekte der Algenqualitäten unterschieden sich höchst signifikant (p < 0,001***) voneinander (siehe Tabelle 51).

Die durchschnittliche kumulative Nachkommenkurve ergab 133 Nachkommen pro Weibchen im Ansatz mit der Futteralge *P. subcapitata* und ca. 97 Nachkommen pro Weibchen im Ansatz mit der Futteralge *M. minutum.* Die wenigste

durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl mit nur 16,1 Nachkommen pro Weibchen wurde bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* beobachtet (Tabelle 51).

Tabelle 51: Reproduktionstest von *M. macrocopa* in Abhängigkeit von Futteralgenqualität. Der Unterschied zwischen den Algen ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte bei Fütterung mit den Algen PS und MM sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Futteralge	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit	
		Vergleich	p-Wert
P. subcapitata (PS)	133	PS vs. MM	< 0,001 ***
M. minutum (MM)	96,7	MM vs. DA	< 0,001 ***
D. armatus (DA)	16,1	PS vs. DA	< 0,001 ***

Überraschenderweise wurde dabei festgestellt, dass die Versuchstiere der Art *M. macrocopa* bei Fütterung mit *P. subcapitata* oder *M. minutum* keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Fruchtbarkeit mehr zeigten, wenn HuminFeed® mit einer Konzentration von 0,54 oder 1,08 mM DOC der Futteralge zugegeben wurde. Das bedeutet, dass die unterschiedlichen Effekte der Algenqualität auf die Reproduktion von *M. macrocopa* durch HuminFeed®-Zugabe ausgeglichen wurden (Abbildung 48).

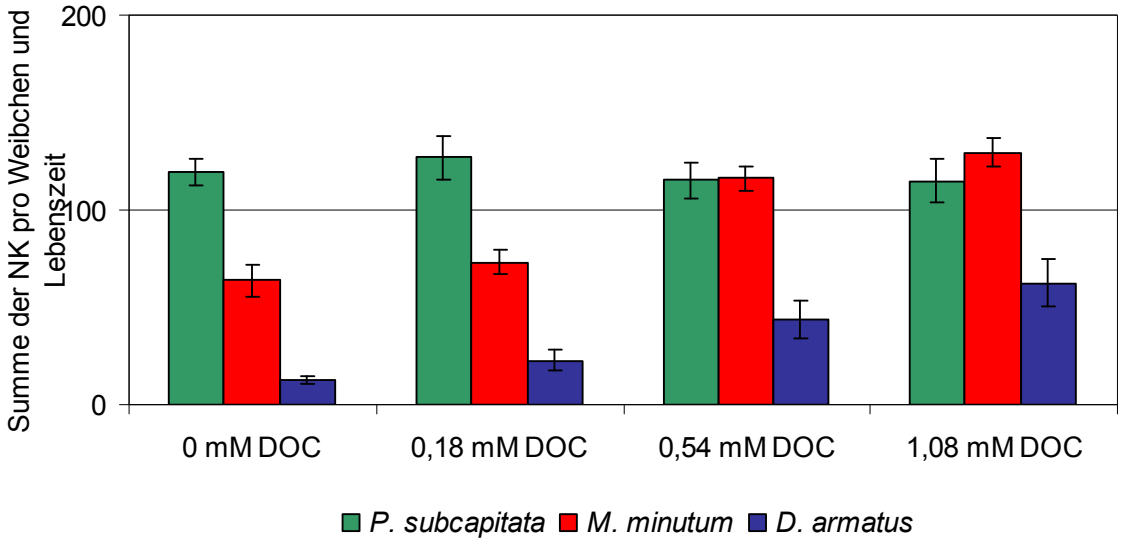

Abbildung 48: vergleichende Darstellung der Summe der Nachkommen (NK) pro Weibchen in der ganzen Lebenszeit von *M. macrocopa* bei verschiedenen Futteralgen und verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

Die signifikant erhöhte durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei Fütterung mit *P. subcapitata* liegt wahrscheinlich an der höheren

Überlebensrate der Versuchstiere im Vergleich zur denen bei Fütterung mit *M. minutum*. Deshalb wurde die Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut ermittelt. Die Datenauswertung hat gezeigt, dass der Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut pro Weibchen bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* mit 19,2 Nachkommen höher als mit der Alge *P. subcapitata* mit 14,5 Nachkommen. Die wenigste Nachkommenzahl mit nur 2,6 hat *M. macrocopa* bei Fütterung mit *D. armatus* produziert (Abbildung 49).

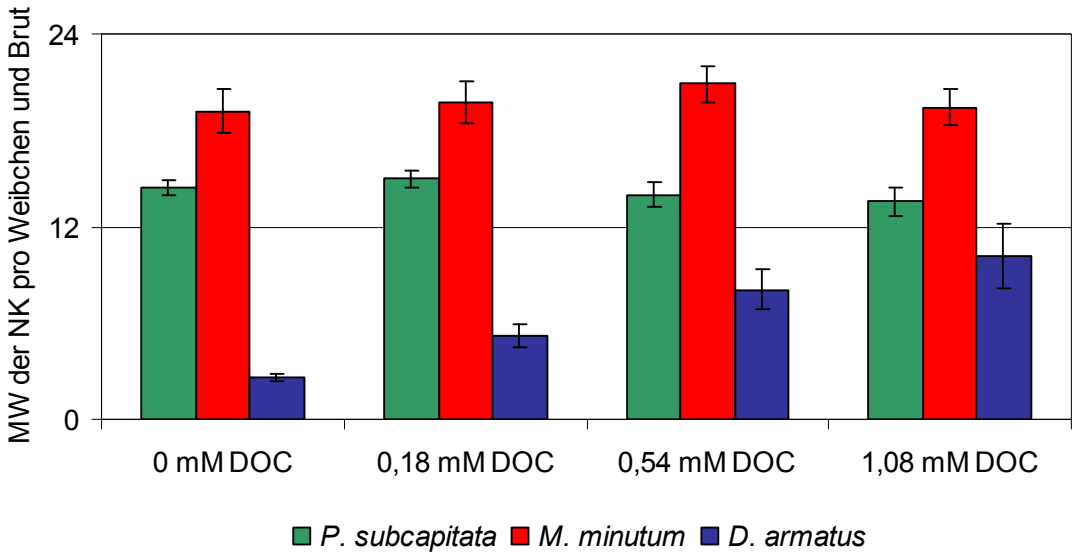

Abbildung 49: Vergleichende Darstellung der Nachkommenzahl (NK) pro Weibchen und Brut von *M. macrocopa* bei verschiedenen Futteralgen und verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

Korrelationen zur Futterqualitäten

Zwischen den durchschnittlichen Lebensspannen von *M. macrocopa* bei Fütterung mit verschiedenen Algen und den Fütterqualitätsfaktoren der Algen wurden zunächst einfache Korrelationen berechnet (Pearson-Korrelation), um eine allgemeine Übersicht zu erhalten (Tabelle 52). Die durchschnittlichen Lebensspannen von *M. macrocopa* bei verschieden Futteralgenqualitäten korrelierten **negativ, aber signifikant** mit der Aminosäure Arginin bzw. nicht signifikant mit dem Gehalt an Stickstoff (R = -0,96 bzw. -0,92; $p < 0,05$* bzw. = 0,08; Pearson-Korrelation). Auch die Korrelation mit dem Gesamtaminosäuregehalt bzw. mit Histidin mit einem Korrelationskoeffizient von R = -0,92 bzw. -0,89 war relativ gut aber nicht signifikant. Dagegen war die

Abhängigkeit von C:N mit einem Korrelationskoeffizient von R = 0,03 sehr schwach (p = 0,97; Pearson-Korrelation).

Tabelle 52: Korrelationskoeffizient (R) und Signifikanzniveaus (p) einfacher Korrelation zwischen den durchschnittlichen Lebensspannen von *M. macrocopa* und verschiedenen Qualitätsfaktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau (p < 0,05*) signifikant und p < 0,001*** höchst signifikant; ns: nicht signifikant.

Qualitätsfaktor	R	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
Σ Fettsäuren	0,82	= 0,18 ns
α-Linolensäure %	0,82	= 0,18 ns
Σ Aminosäuren	-0,92	= 0,08 ns
Arginin	-0,96	< 0,05*
Histidin	-0,89	= 0,1 ns
C:N	0,03	= 0,97 ns
N%	-0,92	= 0,08 ns
C:P	0,50	= 0,5 ns
P%	-0,81	= 0,2 ns

Hinsichtlich der Beeinflussung der Lebensspanne durch den Gehalt an Phosphor (P%) der Futteralgen war eine **gute negative** Korrelation zu verzeichnen (Tabelle 52). Die beste **positive Korrelation** ergab sich für den gesamten Fettsäurengehalt sowie für die α-Linolensäure mit R = 0,82, jedoch erreichte sie keinen signifikanten Wert (p = 0,18; Pearson- Korrelation)

Mit multipler Korrelation soll der Zusammenhang zwischen der Lebensspanne von *M. macrocopa* und den Futteralgenqualitätsfaktoren geklärt werden. Die bei Fütterung mit den drei Algen gewonnenen durchschnittlichen Lebensspannen (Ø LS) wurden mit den verschiedenen Qualitätsfaktoren korreliert, um die vorausgesetzte durchschnittliche Lebensspanne von *M. macrocopa* vorherzusagen. Wurden die Daten der bereits festgestellten unterschiedlichen Ø LS von *M. macrocopa* bei Fütterung mit unterschiedlichen Algen zusammengefasst und mit den verschiedenen Qualitätsfaktoren korreliert, so ergab die multiplen Korrelationen mit der α-Linolensäure (3.Formel) und mit gesamtem Fettsäurengehalt (4.Formel)[24] die wahrscheinlichste Voraussagen.

3. Formel

Ø LS = 0,3 + (0,4 * Σ Aminosäuren %)+ (23,8 * α-Linolensäure%) + (-1,2 * N%)

[24] Hinsichtlich der Formeln: (%): g/100 g Algenbiomasse (für α-Linolensäure und Fettsäure) oder Algentrockenmasse (für Arginin)

4. Formel
Ø LS = 0,2 + (0,4 * Σ Aminosäuren%) + (12,4 * Σ Fettsäuren%) + (-1,2 * N%)

Im Reproduktionstest ergab sich die beste positive signifikante Korrelation für das C:P-Verhältnis mit R = 0,96; p < 0,05* (Pearson- Korrelation). Phosphor (P%) korrelierte signifikant aber negativ mit dem Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut (R = -0,99; p < 0,05*; Pearson-Korrelation). Stickstoff (N%) korrelierte auch negativ aber nicht signifikant mit der Nachkommenzahl (Tabelle 53).

Tabelle 53: Korrelationskoeffizient (R) und Signifikanzniveaus (p) einfacher Korrelation zwischen dem Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut (bei *M. macrocopa*) und verschiedenen Qualitätsfaktoren. Die Korrelation ist auf dem Niveau (p ≤ 0,05*) signifikant und p < 0,001*** höchst signifikant; ns: nicht signifikant.

Qualitätsfaktor	R	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
Σ Fettsäurengehalt	0,19	= 0,8 ns
α-Linolensäure %	0,18	= 0,8 ns
Σ Aminosäurengehalt	-0,93	= 0,07 ns
Arginin	-0,50	= 0,5 ns
Histidin	-0,95	= 0,05*
C:N	0,72	= 0,3 ns
N%	-0,93	= 0,07 ns
C:P	0,96	< 0,05*
P%	-0,99	< 0,05*

Hinsichtlich der Beeinflussung der Reproduktion von *M. macrocopa* durch den gesamten Gehalt an Aminosäuren der Futteralgen war eine **gute negative** Korrelation zu verzeichnen. Die bessere signifikante negative Korrelation ergab sich für Histidin mit R = 0 -0,95. Für Arginin konnte nur eine negative relativ kleine Korrelation ermittelt werden. Für den gesamten Gehalt an Fettsäuren bzw. α-Linolensäure ergab sich eine nur schwache nicht signifikante Korrelationen (Tabelle 53)

4.2.3.2 Diskussion

Da den Versuchstieren stets eine ausreichende Nahrungsmenge zur Verfügung stand, wurden die unterschiedlichen Effekte der Futteralgen auf die Lebensparameter durch die qualitativen Eigenschaften der Algen hervorgerufen. *M. macrocopa* konnte bei allen Futteralgenqualitäten wachsen und sich

reproduzieren. Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife von *M. macrocopa* und die Zeit zwischen zwei Bruten waren durch die Futteralgenqualität **nicht beeinflusst**.

Die Lebensspanne von *M. macrocopa* wurde dagegen höchst signifikant von der Futteralgenqualität beeinflusst. Im Durchschnitt und im Median lebte *M. macrocopa* am längsten bei Fütterung mit *P. subcapitata,* gefolgt von *D. armatus* und dann von *M. minutum* (Abbildung 46).

Biochemische Analyse der drei Algen zeigten, dass *P. subcapitata* mit dem größten Gehalt an Fettsäuren (im Allgemeinen) und an α-Linolensäure (im Speziellen) die beste Futteralgenqualität besaß, gefolgt von *D. aramtus* und dann von *M. minutum*. Im Gegensatz dazu waren *D. armatus* und *M. minutum* reicher an Aminosäuren (im Allgemeinen) und an Arginin (im Speziellen) als *P. subcapitata*. *D. armatus* war die an Phosphor reichste Alge.

Benutzt man die ermittelten multiplen Korrelationsgleichungen, so könnte die vorausgesetzte durchschnittliche Lebensspanne von *M. macrocopa* vorhergesagt werden. Würden die Futteralgen in weiteren Studien analysiert und die Gehalte an Aminosäuren und Fettsäuren bestimmt, könnte man mit den hier entwickelten Formeln (3 und 4) abschätzen, wie lange *M. macrocopa* im Durchschnitt bei Fütterung mit der analysierten Alge leben würde.

Die beiden am wahrscheinlichsten entwickelten Formeln scheinen realistisch zu sein. Bei Nullressourcenkonzentrationen (alle Futterqualitätsfaktoren = 0) wäre die vorausgesetzte durchschnittliche Lebensspanne 1/3 Tag anhand der 3. Formel bzw. 1/5 Tag anhand der 4. Formel. Dies stimmt gut mit den eigenen Erfahrungen mit *M. macrcopa* überein.

Darüber, ob Aminosäuren bzw. Fettsäuren **allein** die Ursache oder lediglich ein Indikator für die Futterqualität der Futteralge sind, geben die **multiplen korrelativen** Ergebnisse jedoch keinen Aufschluss. Daher ist anzunehmen, dass die α-Linolensäure bzw. der gesamte Fettsäuregehalt sowie Aminosäuren (im Allgemeinen) und Arginin bzw. Histidin (im Speziellen) eine große **Vorhersagekraft** für die Futterqualität der Alge besitzen. So sind eigentlich

mehrere Futterqualitätsfaktoren in der Lage, die vorausgesetzte Ø LS von *M. macrocopa* vorherzusagen (Formeln 3 und 4).

Es lässt sich sagen, dass Fettsäuren (im Allgemeinen) und α-Linolensäure (im Speziellen) für die Langlebigkeit von *M. macrocopa* verantwortlich zu sein scheint, da sich die besten positiven Korrelationen für Fettsäuren bzw. α-Linolensäure ergaben.

Die vergleichende Darstellung der Futterqualitätseffekte auf die Reproduktionsleistung von *D. magna* zeigte, dass die höchste durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* vorkam. Dies liegt sicherlich an der höheren Überlebensrate der Versuchstiere im Vergleich bei anderen Futterqualitäten, da *M. macrocopa* sich bis zum Tod reproduzieren kann. Die Reproduktionsrate (also Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut) war jedoch bei Fütterung mit *M. minutum* am höchsten, gefolgt von *P. subcapitat* und dann von *D. armatus*.

Die Messgrößen der Futterqualität wurden mit der Reproduktionsleistung, gemessen als Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut, korreliert, um die Vorhersagekraft der Messgrößen für die Reproduktion abschätzen zu können. die **beste signifikante, aber negative Korrelation** ergab sich im Reproduktionstest für Histidin. Der Gesamtaminosäuregehalt und der Anteil an **Arginin** korrelierten ebenfalls **negativ** mit dem Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut. Für Fettsäuren (im Allgemeinen) und α-Linolensäure (im Speziellen) ergaben sich nur schwache Korrelationen (Tabelle 53).

Anhand der biochemischen Analyse hat die Alge *P. subcapitata* den höchsten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (**p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cids PUFA), vor allem der dreifach ungesättigten α-Linolensäure (C18:3n-3). Sie besitzt mit 3,8 mg/ g eine Algenbiomasse, die ca.12 mal höher liegt als der α-Linolensäurewert bei der Alge *D. armatus*. Das könnte die **exzellente Qualität der Futteralge *P. subcapitata*** in Bezug auf die Lebensspanne und Reproduktion von *M .macrocopa* erklären. Dagegen enthielt *M. minutum* nur sehr geringe Mengen der α-Linolensäure (0,08 mg/ g Algenbiomasse).

Obwohl Phosphor ein wichtiger Bestandteil der Phospholipide, des Stoffwechselenergiespeichers Adenosintriphosphat (ATP) und der Nukleinsäure ist, und im Wachstum und in der Reproduktion der Zooplankter beteiligt ist (Ferrão-Filho et al. 2003; Vrede et al. 2002, 2004), konnte im vorliegenden Versuch nur negative Korrelation zwischen der Reproduktionsrate und dem Gehalt am Phosphor (P%) ermittelt werden (Tabelle 53). So wurde die geringste Nachkommenzahl von *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus,* die reichste an Phosphor ist. Daher ist es denkbar, dass der Phosphor nicht allein die entscheidende Rolle für das Wachstum und die Reproduktion in *M. macrocopa* spielt, sonder zusammen mit andren Futterqualitätsfaktoren.

Stellen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren die limitierende Ressource dar, so eignen sich die Fettsäuregehalte der Futteralge besser zur Vorhersage der Futteralgenqualität als der Phosphorgehalt. Dies wird durch die vorliegenden Arbeit gestützt, bei welcher der α-Linolensäuregehalt der Futteralge *P. subcapitata* die bessere Vorhersagegröße für die Futterqualität für die Reproduktion von *M. macrocopa* aufwies als der Phosphorgehalt, denn die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *M. macrocopa* korrelierte besser mit dem Gehalt der α-Linolensäure als mit dem Phosphorgehalt der Futteralgen. Daher scheint der Phosphorgehalt der Futteralgen nicht unbedingt eine entscheidende Rolle bei der Reproduktion von *M. macrocopa* zu spielen. Dagegen scheint der Phosphorgehalt der Futteralgen wichtig für **das Überleben** von *M. macrocopa* zu sein, da die Versuchstiere bei Fütterung mit der phosphorreichen Alge *D. armatus* **länger lebten** als bei Fütterung mit der phosphorarmen *M. minutum*. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Ergebnissen einer Studie überein, in der nachgewiesen wurde, dass die Versuchstiere der **Cladocere** *Daphnia galeata* bei der Fütterung mit nicht-phosphorlimitierter Alge *Scenedesmus quadricauda* **länger lebten** als bei Fütterung mit der phosphorlimitierten Alge *S. quadricauda* (Sundbom & Vrede 1997). Als weitere Erklärung, warum die Lebensspanne von *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Alge *D. armatus* länger war als bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*, kommt der **Lipid-Gehalt der Alge *D. armatus* in Betracht.** Lipide sind der dominante Energiespeicher der Zooplankter (60- 70% von ihrer Masse) und spielen eine wesentliche Rolle beim Überleben (Wetzel 2001). Die biochemische Analyse haben ergeben, dass die Alge *D. armatus* reicher an Fettsäuren (Gruppe

der Lipide) ist als die Alge *M. minutum*. Daher könnte man davon ausgehen, dass der **Fettsäuregehalt** der Alge *D. armatus* eine **potentielle Rolle** für die Lebensverlängerung von *M. macrocopa* spielen könnte im Vergleich zu der Alge *M. minutum*.

Die geringste Nachkommenzahl von *M. macrocopa* auf Grund der Größe der Alge *D. armatus* (Ø 5 – 8 µm) erscheint unwahrscheinlich. Nadini et al. (2004) haben nachgewiesen, dass *M. macrocopa* die Kolonien ausbildende Grünalge *Scenedesmus quadricauda* (30 µm) fressen kann. Darüber hinaus lebte *M. macrocopa* auf dieser Alge länger (auf Kosten der Populationswachstumsrate) als auf der einzelzelligen Alge *Chlorella vulgaris.* Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da *M. macrocopa* bei Fütterung mit der Coenobien (spezifische Kolonie) bildenden Grünalge *D. armatus* länger lebte (aber weniger reproduzierte) als bei Fütterung mit der einzelzelligen Alge *M. minutum*. Dieses Ergebnis könnte auf die **Energieallokation** (zwischen Langlebigkeit und Reproduktion) zurückzuführen sein. *D. armatus* könnte durch besondere **Zellwandstrukturen bzw. –eigenschaften** (nicht ermittelt) eine geringere Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit erreichen. Daher ist es denkbar, dass die *M. macrocopa* durch die reduzierte Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit der Alge *D. armatus* betroffen waren. Wegen der relativ geringen Reproduktionsrate von *M macrocopa* auf *D. armatus* bleibt es fraglich, ob *M. macrocopa* in der Kontrollgruppe nur Bakterien (da die Arbeit mit xenischen Medien) gefressen hatte und somit wachsen und sich reproduzieren konnte.

M. macrocopa produzierte bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* im Mittelwert mehr Nachkommen pro Brut als mit der Alge *D. armatus*, obwohl *M. minutum* ärmer an Phosphor und an Fettsäuren war. Es könnte auf die Fressbarkeit bzw. auf die Verdaubarkeit der Futteralge zurückzuführen sein. Außerdem stellte *M. minutum* auch eine gute Futterqualität für die Populationswachstumsrate einer Zooplanktonsart, nämlich der Rotifere *Brachionus calydftorus* dar (Rothhaupt 1988; Mohr & Adrian 2002).

P. subcapitata ist reicher an Fettsäuren und Phosphor aber nicht an Arginin als *M. minutum*. Um festzustellen, dass Arginin für die erhöhte Reproduktionsrate von *M.*

macrocopa bei Fütterung mit *M. minutum* im Vergleich mit *P. subcapitata* verantwortlich wäre, müsste in weiteren Studien überprüft werden, was passieren würde, wenn eine Supplementierung mit Arginin bei der Alge *P. subcapitata* vorgenommen werden würde. Veränderungen der Futterqualität durch die Supplementierungen sollten Hinweise auf die Art der Limitierung von *M. macrocopa* geben.

Aus den oben diskutierten Ergebnissen von *M. macrocopa* und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Effekte von HuminFeed® bei Fütterung mit verschiedenen Algen, und da die Futteralgenqualität der einzige veränderte Parameter (Versuchsfaktor) in den Versuchen war und alle anderen Versuchsbedingungen identisch waren, ist es denkbar, dass es eine bottom-up-Steuerung der Energieallokation (zwischen Lebensspanne und Reproduktion) in *M. macrocopa* durch die Futteralgenqualität gibt. Denn die Effekte des chemichen Stresses ausgelöst durch HuminFeed® auf die Lebensparameter von *M. macrocopa* waren unterschiedlich ausgeprägt bei den verschiedenen Futterqualitäten. Auffällig war weiterhin, dass die HuminFeed®-Zugabe mit einer Konzentration von 0,54 oder 1,08 mM DOC die Unterschiede in der Gesamtnachkommenzahl pro Weibchen bei Fütterung mit *P. subcapitata* oder mit *M. minutum* ausgeglichen haben (Abbildung 48). Dies könnte die Aussage bestätigen, dass Huminstoffe als zusätzliche **Nährstoffquelle** wirken können (Jones 1992, Steinberg et al. 2006). Es bleibt daher für weitere Studien die Frage offen, in wie weit sich die Futteralgenqualität durch **bottom-up-Steuerung** in einer *Moina*-Population gegen unterschiedliche Stressoren (z. B. toxische Substanzen, Parasiten, Temperatur usw.) **durchsetzt**.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich unterschiedliche Futterqualitäten signifikant verschieden auf die Lebensparameter von *M. macrocopa* auswirken. Wie stark der Einfluss der Futterqualität im Vergleich zu anderen Umweltfaktoren ist, die ebenfalls die lokale Akklimatisierung von *M. macrocopa* beeinflussen (z.B. Temperatur, Fraßdruck usw.), bleibt in weiteren Studien zu überprüfen.

4.2.4 *Moina micrura*

4.2.4.1 Ergebnisse

Nur zwei der ausgewählten Futteralgen (*P. subcapitata* und *M. minutum*) waren unter den gegebenen Versuchsbedingungen für die Versuchstiere der Art *M. micrura* von ausreichender Qualität, so dass *M. micrura* sich erfolgreich reproduzieren konnten. Die vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Lebensdauertests von *M. micrura* bei den beiden Futteralgenqualitäten in Abbildung 50 zeigt, dass sich die Futteralgenqualitäten auf das Überleben der Versuchstiere nicht signifikant auswirkten ($p > 0{,}05$; Log Rank Test).

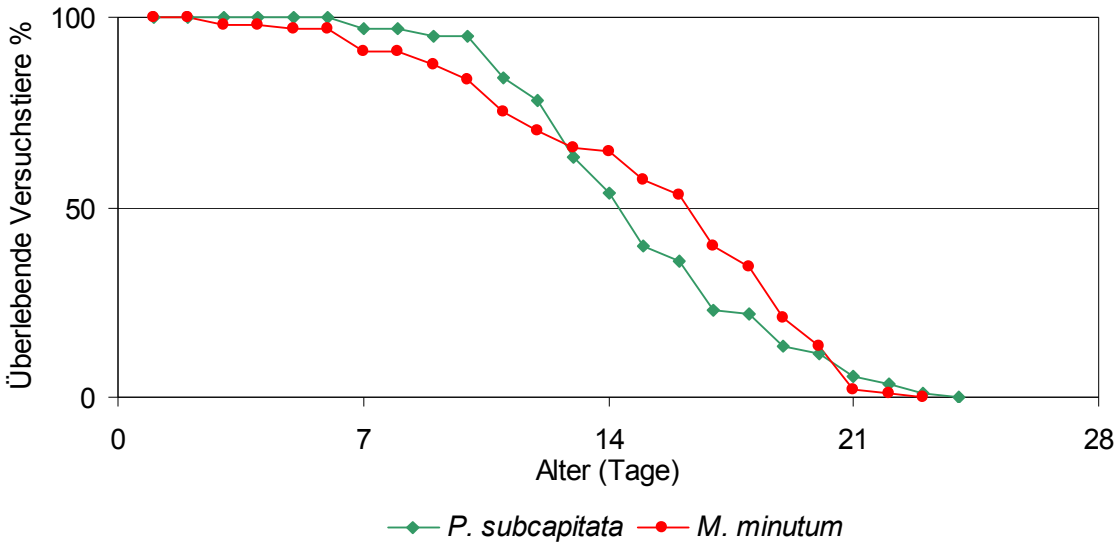

Abbildung 50: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Lebensdauertests von *M. micrura* bei verschiedenen Futteralgen. Die Effekte der Algenqualitäten unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe auch Tabelle 54).

Jedoch zeigte sich deutlich, dass sowohl die mediane als auch die durchschnittliche Lebensspanne der Versuchstiere bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* größer ist als bei Fütterung mit *P. subcapitata* (Tabelle 54). Die maximale Lebensspanne der Versuchstiere bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* ist kleiner als bei Fütterung mit *M. minutum*. Sie ist jedoch aufgrund ihrer Beschränkung auf ein einzelnes Versuchstier für sich allein stehend nicht besonders aussagekräftig.

Tabelle 54: Lebensdauertest von *M. micrura* in Abhängigkeit von Futteralgenqualität. Der Unterschied zwischen den Algen ist nicht signifikant (ns). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Futteralgen	Median	Mittelwert	Maximal	Irrtumswahrscheinlichkeit p-Wert	
P. subcapitata (PS)	14,6	15,1	22	PS vs. MM	=0,37 ns
M. minutum (MM)	15,7	15,4	21		

Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife von *M. micrura* und die Zeit zwischen zwei Bruten waren durch die Algenqualität **nicht beeinflusst**. Die Effekte der Futteralgenqualitäten auf die Reproduktion unterschieden sich jedoch höchst signifikant voneinander (p < 0,001***; T-Test). Der Einfluss verschiedener Futteralgen auf die Reproduktion von *M. micrura* ist in der nachstehenden Abbildung 51 zu erkennen.

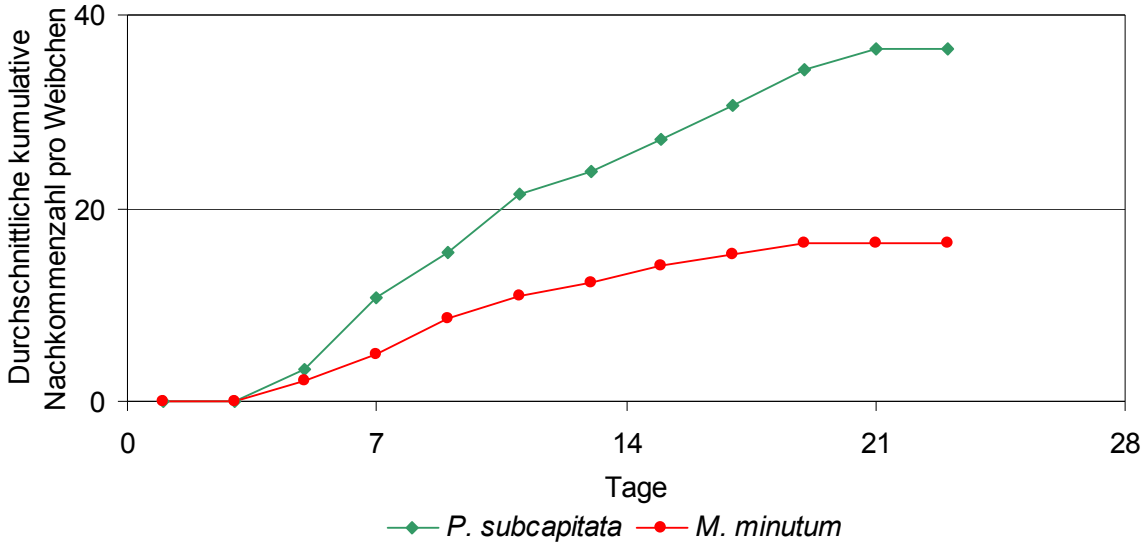

Abbildung 51: vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Reproduktionstests von *M. micrura* bei verschiedenen Futteralgen. Die Effekte der Algenqualitäten unterschieden sich höchst signifikant (p < 0,001***) voneinander (siehe Tabelle 55).

Die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* lag bei 36,4 Nachkommen pro Weibchen und damit über der durchschnittlichen kumulativen Nachkommenzahl bei Fütterung mit der Alge *M. minutum* (16,3 Nachkommen pro Weibchen), was eine höchste signifikante Erhöhung um ca. 123% darstellt.

Tabelle 55: Ergebnisse des Reproduktionstests von *M. micrura* in Abhängigkeit von Futteralgenqualität. Der Unterschied zwischen den Algen ist auf dem Niveau ($p < 0{,}001$***) höchst signifikant. Alle Datenpunkte bei Fütterung mit den Algen PS und MM sind Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Futteralge	durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen	Irrtumswahrscheinlichkeit p-Wert	
P. subcapitata (PS)	36,4	PS vs. MM	< 0,001 ***
M. minutum (MM)	16,3		

Damit die Ergebnisse von *M. micrura* vergleichbar mit denjenigen von *M. macrocopa* sind, wurden hier auch eine vergleichende Darstellung der Reproduktionsdaten von *M. micrura* bei verschiedenen Futteralgen und verschiedenen Konzentrationen vom HuminFeed® (Abbildungen 52 und 53) vorgenommen. Die HuminFeed®-Zugabe hat die Unterschiede der Algenqualitäten auf *M. micrura* nicht ausgeglichen. Es zeigt sich deutlich in Abbildung 52, dass die die Summe der Nachkommen pro Weibchen während der ganzen Lebensspanne in *M. micrura* bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* immer (mit oder ohne HuminFeed®-Zugabe) **höchst signifikant** höher war als bei Fütterung mit *M. minutum*.

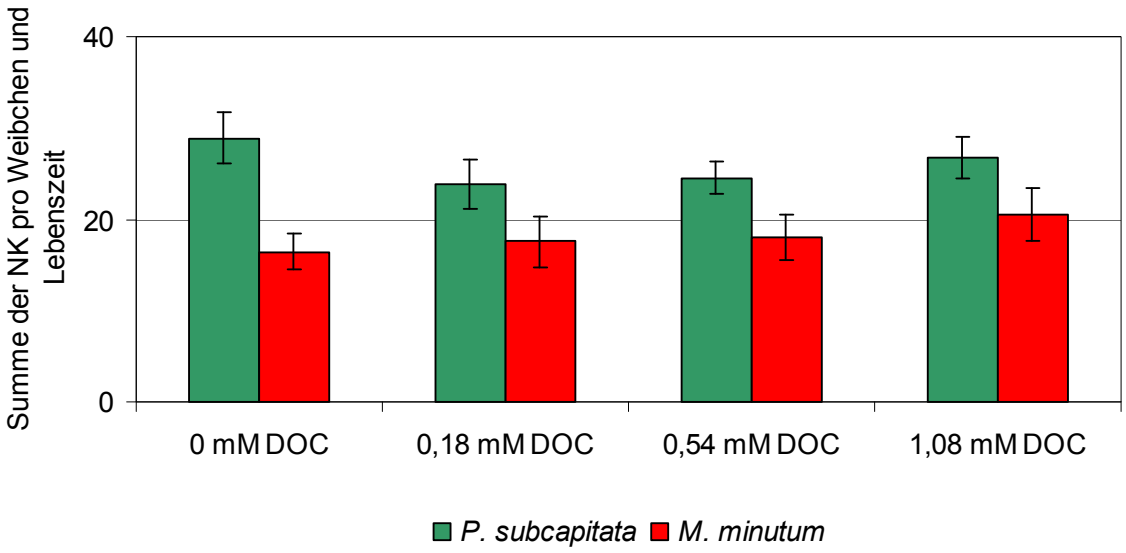

Abbildung 52: vergleichende Darstellung der Summe der Nachkommen (NK) pro Weibchen in der ganzen Lebenszeit von *M. micrura* bei verschiedenen Futteralgen und verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

Wurde der Mittelwert der Nachkommenzahl pro Weibchen und Brut berücksichtigt, zeigten sich die unterschiedlichen Effekte der Futteralgenqualitäten auf die

Reproduktion von *M. micrura* (mit oder ohne HuminFeed®-Zugabe) noch deutlicher. So produzierte *M. micrura* bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* fast 91% mehr Nachkommen pro Brut als bei Fütterung mit *M. minutum* in Kontrollgruppen (ohne HuminFeed®).

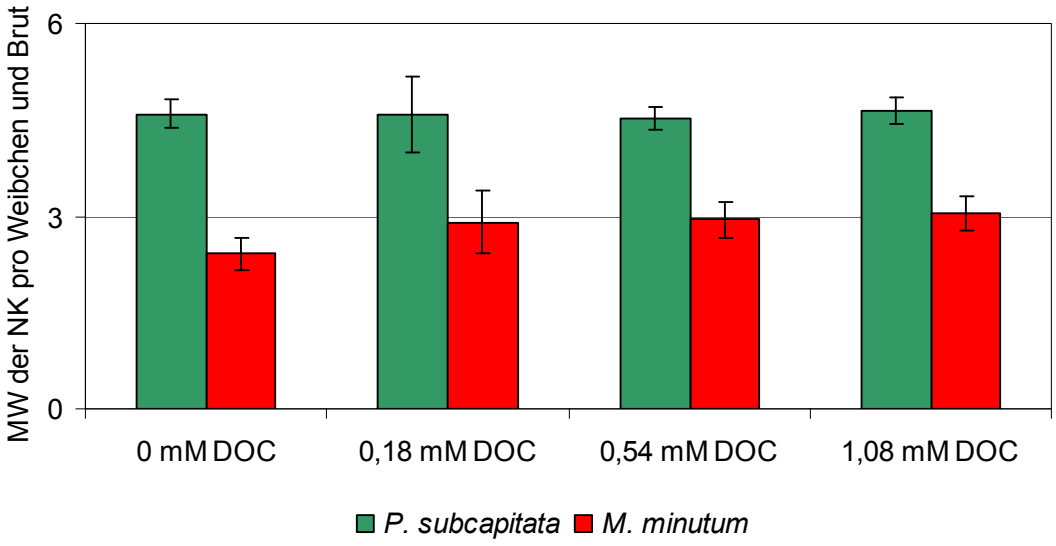

Abbildung 53: Vergleichende Darstellung der Nachkommenzahl (NK) pro Weibchen und Brut von *M. micrura* bei verschiedenen Futteralgen und verschiedenen HuminFeed®-Konzentrationen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte (MW) ± **S**tandard **E**rror of the **M**ean (SEM) von 10 Proben.

4.2.4.2 Diskussion

Bei Fütterung mit der Futteralge *D. armatus* konnte *M. micrura* **nicht gut wachsen** und sich **kaum reproduzieren**. Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife war **relativ lang** (8 Tage) im Vergleich zur Dauer der Entwicklung bis zur Reife bei anderen Futteralgenqualitäten (3-4 Tagen). Die Limitation des Wachstums und der Reproduktion von *M. micrura* durch den Phosphorgehalt der Alge *D. armatus* erscheint unwahrscheinlich, denn diese Alge hat den höchsten Phosphorgehalt im Vergleich zu den anderen Futteralgen und das C:P Verhältnis war mit 708:1 unter einem nachgewiesenen Schwellenwert des C:P- Verhältnisses (siehe z. B. Sterner et al. 1993), der für die Wachstumslimitation von Daphnien verantwortlich ist (für Moina wurden keine veröffentlichten Daten dafür gefunden bzw. sind überhaupt

noch keine Daten vorhanden)[25]. Daher scheint der Phosphorgehalt der Futteralgen nicht unbedingt eine entscheidende Rolle bei der Reproduktion von *M. micrura* zu spielen. Wenn das C:P-Verhältnis unterhalb des Schwellenwerts liegt, ist das Wachstum durch andere Futterinhaltsstoffe limitiert (Sundbom & Vrede 1997). Eine Limitation durch Aminosäuren ist auch unwahrscheinlich, da die biochemische Analyse gezeigt hat, dass *D. armatus* die an Aminosäuren reichste Futteralge ist. Hinsichtlich des Fettsäuregehaltes hat *D. armatus* einen relativen geringen spezifischen Gesamtfettsäuregehalt (0,066 g/100 g Algenbiomasse), was eine suboptimale Futterqualität darstellen könnte.

Die Limitation des Wachstums und der Reproduktion von *M. micrura* durch die fressbare Größe der Alge *D. armatus* (Ø 5 – 8 µm) erscheint unwahrscheinlich. Pagano (2008) hat nachgewiesen, dass *M. micrura* die als Coenobium ausbildende Grünalge *Coelastrum reticulatum* (20 – 40 µm ESD)[26] fressen kann. Auch wenn die Alge *D. aramtus* im Ultraschall zerstört wurde, wurde sie von *M. micrura* nicht gefressen bzw. nicht gut verdaut. *D. armatus* könnte durch besondere **Zellwandstrukturen bzw. –eigenschaften** eine geringere Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit erreichen. Daher ist es denkbar, dass *M. micrucura* durch die reduzierte Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit der Alge *D. armatus* betroffen wären. Es lässt sich jedoch in weiteren Studien ermitteln.

M. micrura konnte nur bei zwei der drei Futteralgen, *P. subcapitata* und *M. minutum*, **gut wachsen und sich reproduzieren**. Die Dauer der Entwicklung bis zur Reife von *M. micrura* und die Zeit zwischen zwei Bruten waren durch die Qualität beider Futteralgen **nicht beeinflusst**. Bei Fütterung mit der Futteralge *D. armatus* konnte *M. micrura* **nicht gut wachsen** und sich **kaum reproduzieren** (es wurde bereits oben versucht, die potentiellen Gründe dafür zu diskutieren). Die Lebensspanne von *M. micrura* wurde durch die Qualität der Futteralgen nicht signifikant beeinflusst. Jedoch lebten die Versuchstiere im Durchschnitt und im Median bei Fütterung mit *M. minutum* **tendenziell länger** als mit *P. Subcapitata*

[25] Die Literatur-Recherche erfolgte unter Verwendung des Internets vorwiegend. Hier wurden Datenbanken wie z. B. „ISI Web of Knowledge“, „PubMed“ und „ScienceDirect“ durchsucht. Erganzend wurde die Suchmaschine „Google Scholar“. Letzte Recherche war am 03.04.11

[26] SED: equivalent spherical diameter (Kugeläquivalentdurchmesser)

(deutlich im zweiten Teil des Lebens). Die Versuchstiere **reproduzierten sich** auf *P. subcapitata* **mehr** als auf *M. minutum*. Diese Ergebnisse könnten auf die **Energieallokation** (zwischen Langlebigkeit und Reproduktion) zurückzuführen sein.

Anhand der biochemischen Analyse hat die Alge *P. subcapitata* den höchsten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (**p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cids PUFA), vor allem an der dreifach ungesättigten α-Linolensäure (C18:3n-3). Sie besitzt mit 3,8 mg/g Algenbiomasse ca. 48-mal mehr **α-Linolensäure** als die Alge *M. minutum*, die aber höhere Prozentanteile der gesättigte Palmitinsäure (16:0) und der einfach ungesättigten Ölsäure (18:1) enthielt (Tabelle 42). PUFA sind als ein wichtiger Indikator der Nahrungsqualität für die Cladoceren beschrieben (z. B. von Elert 2002). Das könnte die **exzellente Qualität der Futteralge *P. subcapitata*** für die Reproduktion von *M. micrura* erklären. Außerdem war die Alge *P. subcapitata* **reicher an Phosphor** als die Alge *M. minutum* (Tabelle 44).

Ein weiterer experimenteller Hinweis für eine Limitation der Wachstums- und der Reproduktionsrate von Cladoceren (unter anderem *M. micrura*) durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurde von Ferrão-Filho et al. (2003) erbracht. Bei der Fütterung mit einer phosphorlimitierten, **aber mit PUFA**, **supplementierten** Alge *Scenedesmus spinosus* lassen sich die Wachstums- und die Reproduktionsrate von *M. micrura* fast auf die einer nichtlimitierten Alge der gleichen Art aufbessern. Darüber hinaus wächst *M. micrura* und reproduziert sich bei Fütterung mit einer phosphorgesättigten Alge *S. spinosus* besser als bei Fütterung mit einer phosphorlimitierter *S. spinosus*. Dies stimmt gut mit den vorliegenden Ergebnissen von *M. micrura* überein, da *M. micrura* sich bei Fütterung mit der phosphorreichen Alge *P. subcapitata* **mehr reproduzierte** als bei Fütterung mit der phosphorärmeren Alge *M. minutum*.

Die Aminosäureanalyse ergab, dass sich die beiden Algen *P. subcapitata* und *M. minutum* in Speziellen unterschieden, aber nicht im Allgemeinen. So hat *M. mintum* ca. 1,4 mal mehr Arginin als *P. subcapitata*. Die Reproduktion von *M. micrura* war auf *P. subcapitata* signifikant höher als auf *M. minutum*, während die Lebensspanne auf *M. minutum* tendenziell länger war als auf *P. subcapitata*.

Daher ist es denkbar, das Arginin für die Langlebigkeit von *M. micrura* verantwortlich ist.
Da *M. micrura* nur auf zwei Algen wachsen und sich reproduzieren konnte, konnte keine multiple Korrelation ermittelt bzw. entwickelt werden.

Die Effekte des chemischen Stresses ausgelöst durch HuminFeed® auf die Lebensparameter von *M. micrura* waren bei verschiedenen Futteralgen unterschiedlich (Abbildungen 40, 41, 42 und 43). So wirkte HuminFeed® sowohl auf die Lebensspanne und das Wachstum als auch auf die Reproduktion negativ (teilweise signifikant) bei Fütterung mit der hier als optimal beschriebenen Alge *P. subcapitata*, während bei Fütterung mit der Alge *M. minutum*, die ärmer an Phosphor und an Fettsäuren ist, sich HuminFeed® signifikant bzw. höchst signifikant negativ auf die Lebensspanne und tendenziell positiv auf die Reproduktion von *M. micrura* auswirkte. Davon könnte man ausgehen, dass die Futteralgenqualität **die Energieallokation** (zwischen Lebensspanne und Reproduktion) in *M. micrura* gesteuert hat (**bottom-up-Steuerung)**.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die unterschiedlichen Effekte der Algenqualität auf die Reproduktion von *M. micrura* durch HuminFeed®-Zugabe nicht ausgeglichen wurden (Abbildung 52). Im Gegensatz dazu wurde bei *M. macrocopa* wurde festgestellt, dass die HuminFeed®-Zugabe dem Medium die Qualität der Futteralgen ausgeglichen hat (Abbildung 48). Wie werde die HuminFeed®-Zugabe die Futteralgenqualität in einem Konkurrenzversuch der beiden Arten (*M. macrocopa* und *M. micrura*) beeinflussen, bleibt in weiteren Studien zu überprüfen und sollte Hinweis über die Toleranz der beiden Art bei verschieden Futterbedingungen geben.

5 Schlussfolgerung

In vielen Versuchen war es auffällig, dass sich die Quantität (Zahl pro Weibchen und Brut) und die Qualität (Große, Form und Schwimmgeschwindigkeit) der Nachkommen der Versuchstiere (mit oder ohne HuminFeed®) in den letzten Versuchstagen verschlechtert haben (wie z. B. bei *M. macrocopa* auf *M. minutum*). Neben den hier gefundenen Ergebnissen lassen sich auch in der Literatur Hinweise dafür finden, dass bei der **Cladocere** *D. magna* die **Größe** der Nachkommen positiv mit dem Alter ihrer Mutter korreliert (Glazier 1992) und auch die **Gelegengröße** bei *D. magna* vom **Alter** der Mutter abhängig ist (Porter et al. 1983).

Als Schlussfolgerung lässt es sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

Effekte der Huminstoffe

Erste Beobachtung in Versuchen der vorliegenden Arbeit war die Vitalität und die veränderte Farbe der Versuchstiere bei der Exposition gegenüber HuminFeed®. HuminFeed® besteht aus einem hohen Gehalt (18%) an niedermolekulargewichtigen Komponenten LMW (Low-molecular weight), was eine **Aufnahme** durch den Organismus begünstigt (Meinelt et al. (2007). Das könnte erklären, warum die exponierten Versuchstiere in vielen Versuchen (z. B. *D. galeata* auf *P. subcapitata*) **dunkler** als die Versuchstiere im Kontrollansatz waren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Huminstoffe, am Beispiel des HuminFeeds®, in umweltrelevanten Konzentrationen Effekte auf Lebensparameter von vier Cladoceren (*Daphnia magna*; *D. galeata*; *Moina macrocopa* und *M micrura*) nahm. Die Ergebnisse verdeutlichen jedoch die Notwendigkeit von Langzeitstudien, da HuminFeed® bei vielen im Labor durchgeführten Experimenten Langzeiteffekte verursachte. So traten bei den Experimenten mit *D. magna* Effekte auf, die bei einer kürzeren Expositionsdauer nicht berücksichtigt worden wären. Auch bei *D. galeata*, die HuminFeed® in

umweltrelevanten Konzentrationen ausgesetzt waren, konnte erst ab der 3. Lebenswoche auffällige Effekte auf die Lebensparameter beobachtet werden.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass diese aquatischen Organismen verschieden sensitiv und somit sehr individuell auf die Huminstoffe reagieren. Auf *D. magna* bzw. *D. galeata* wirkte sich HuminFeed® bei verschiedenen Futteralgenqualitäten **positiv auf die Lebensspanne** und negativ auf die Reproduktion aus. In huminstoffreichen Gewässern könnte dies für Daphnien von Vorteil sein, da Daphnien sich bis zum Tod reproduzieren können. Allerdings wurde bei *M. macrocopa* und *M. micrura* festgestellt, dass HuminFeed® unterschiedliche Auswirkungen auf denselben Klon haben konnte. Während sich bei Fütterung mit *M. minutum* positive Effekte auf Lebensspanne und Reproduktion zeigten, konnte entgegen bei Fütterung mit der Alge *P. subcapitata* kaum Effekte und bei Fütterung mit *D. armatus* positive Effekte auf die Reproduktion und negative Effekte auf die Lebensspanne festgestellt werden. In Versuchen mit *M. micrura* wurde ermittelt, dass HuminFeed® stets einen negativen Effekt auf die Lebensspanne der Versuchstiere erzielte. Aber auf die Reproduktion wirkte HuminFeed® negativ bei Fütterung mit *P. subcapitata* und positiv bei Fütterung mit *M minutum*. Wahrscheinlich konnten unterschiedliche Futteralgenqualitäten der Futteralgen zu solch unterschiedlichen Ergebnissen führen. Daher ist denkbar, dass die Energieallokation zwischen Lebensspanne und Reproduktion unter chemischem Stress ausgelöst durch HuminFeed® und durch Futteralgenqualität gesteuert wurde.

Es bleibt aber für weitere Studien die Frage offen, inwieweit sich die bottom-up-Steuerung durch die Futteralgenqualität in einer *Moina*-Population gegen unterschiedliche Stressoren (z. B. Temperatur, Parasiten usw.) durchsetzt.

Außerdem könnte der selektive Einfluss von Huminstoffen, aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Cladoceren, die Zusammensetzung der Zooplanktongemeinschaft und damit der gesamten Biozönose mitbestimmen, da Zooplankton als Hauptkonsumenten der Primärproduktion sowie als

Nahrungsgrundlage vieler Fischarten eine bedeutende Rolle im Nahrungsnetz limnischer Systeme einnehmen.

Multigenerationsversuch

Über drei Generationen zeigten sich die Huminstoffeffekte am deutlichsten in der Reproduktion. Dabei produzieren die Versuchstiere der Pseudokontrolle mehr Nachkommen als Kontrolltiere. Prinzipiell ist eine erfolgreiche Reproduktion für alle Arten eine wichtige Voraussetzung zur Erhaltung der Art. Die Vermutung, dass eine epigenetische Programmierung der Grund für die erhöhte Fruchtbarkeit der Pseudokontrolltiere war, müsste in nachfolgenden Studien nachgewiesen werden.

Der Multigenerationsversuch zeigte, dass sich die Daphnien zwar kurzzeitig an die schädliche Wirkung des Huminstoffpräparates HuminFeed® akklimatisieren können. Da HuminFeed® sich auf die Reproduktionsmode jedoch nicht kontinuierlich auswirkte, verdeutlichen diese Ergebnisse die Notwendigkeit eine Ausweitung der Expositionsdauer über mehrere Filialgenerationen, denn die Effekte von Huminstoffen auf den untersuchten Parameter könnten hier über nur drei Generationen unter- oder überschätzt werden. Darüber hinaus liegt die Vermutung nahe, dass aquatische Organismen wahrscheinlich aufgrund zu hoher Fitnesskosten keine dauerhafte Resistenz gegenüber den in die Gewässer eingetragenen Huminstoffen entwickeln können.

Futteralgenqualität

Da die drei Futteralgen in der Lage waren, sich unterschiedlich auf Lebensparameter auszuwirken, wurden diese drei Algen biochemisch und mineralisch analysiert, um den Unterschied in der Wirkungsweise dieser verschiedenen Futteralgen aufklären zu können. Die Analysen der Futteralgen haben gezeigt, dass sich die drei Algen wesentlich voneinander unterschieden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass *D. magna* sich am besten bei Fütterung mit *P. subcapitata* reproduzierte aber am längsten auf *D. armatus* lebte. Da *P. subcapitata* die an Fettsäuren reichste Alge war, während *D. armatus* die an Phosphor und an Aminosäuren (sowohl in Bezug auf den gesamten Gehalt an Aminosäuren als auch in Bezug auf den prozentuellen Anteil der einzelnen Aminosäuren Arginin und Histidin) reichste Alge war. Mit Hilfe einfacher Korrelationen und einer multiplen Korrelation scheinen Aminosäuren für Langlebigkeit und Fettsäuren für die Reproduktion von *D. magna* verantwortlich zu sein.

Mit *D. galeata* konnten nur bei Fütterung mit *P. subcapitata* endgültige Lebensspanne- und Reproduktionsdaten ermittelt werden, da in den Versuchen bei Fütterung mit *M. minutum* vermutlich ein Parasitenbefall auftrat und auf *D. armatus* kein Versuch durchgeführt werden konnte. Neben dem qualitativen Nährwert der Futterpartikel spielt auch deren Fressbarkeit bzw. Verdaubarkeit eine entscheidende Rolle für die Daphnien, da diese nur Partikel in einem bestimmten Größenspektrum ingestieren können. *D. armatus* kommt häufig als Coenobium (spezifische Kolonie) vor. *D. armatus* könnte auch durch besondere Zellwandstrukturen eine geringere Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit erreichen. Daher ist es denkbar, dass *D. galeata* (hauptsachlich die neugeborenen Tiere) durch die reduzierte Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit der Alge *D. armatus* betroffen waren. Es lässt sich jedoch in weiteren Studien ermitteln. In weiteren Studien sollte auch untersucht werden, wie sich Futtermischungen unterschiedlicher Ingestierbarkeit auf die Fitness der Tiere (Lebensspanne und Reproduktion) auswirken.

M. macrocopa konnte auf alle Futteralgen wachsen und sich reproduzieren. Die Lebensspanne und die Reproduktionsrate waren jedoch von der Qualität der Futteralgen beeinflusst. So lebte sie am längsten auf *P. subcapitata* und reproduzierte sich im Durchschnitt pro Weibchen und Brut am meisten auf *M. minutum*. *P. subcapitata* ist reicher an Fettsäuren (insbesondere α-Linolensäure) und Phosphor aber nicht an Arginin als *M. minutum*. Um festzustellen, dass Arginin für die erhöhte Reproduktionsrate bzw. die α-Linolensäure für die Lebensverlängerung von *M. macrocopa* verantwortlich sind, müsste in weiteren

Studien überprüft werden, was passieren würde, wenn eine Supplementierung mit Arginin bei der Alge *P. subcapitata* bzw. mit α-Linolensäure bei *M. minutum* vorgenommen werden würde. Veränderungen der Futterqualität durch die Supplementierungen sollten Hinweise auf die Art der Limitierung von *M. macrocopa* geben. Auf *D. armatus* vermehrt sich *M. macrcopa* am geringsten. Es könnte auf die Fressbarkeit bzw. auf die Verdaubarkeit dieser Futteralge zurückzuführen sein.

Bei der Betrachtung der Versuchsergebnissen von *M. micrura* ist festzustellen, dass sie bei Fütterung mit *D. armatus* nicht gut wachsen und sich kaum reproduzieren konnte. Es ist denkbar, dass *M. micrura* von der **reduzierten Verdaubarkeit bzw. Verwertbarkeit** der Alge *D. armatus* betroffen sein könnte (s. Abschnitt 4.2.4.2).

Die Reproduktion von *M. micrura* war auf *P. subcapitata* signifikant höher als auf *M. minutum*, während die Lebensspanne auf *M. minutum* tendenziell länger war als auf *P. subcapitata*. Daher ist es denkbar, das Arginin für die Langlebigkeit von *M. micrura* verantwortlich, da *M. minutum* reicher an dieser Aminosäure als *P. subcapitata* ist, und α-Linolensäure für die Reproduktion von *M. micrura* verantwortlich ist, da *P. subcapitata* reicher an dieser Fettsäure als *M. minutum* ist.

Literaturverzeichnis

Ahlgren, G.; Lundstedt, L.; Brett, M.; Forsberg, C. (1990): Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. J. Plankton Res. Vol.12 No.4: 809-818.

Ahlgren, G.; I.B. Gustafsson; Boberg, M. (1992): Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. J. Phycol. (28): 37-50.

Anway, M.D.; Cupp, A.S.; Uzumcu, M.; Skinner, M.K. (2005): Epigenetic mtransgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science (308):1466–1469.

Bittner, K; Ebert, D. ; Rothhaupt, K.O. (1998): Parasitismus bei *Daphnia* im Bodensee. In: DGL/SIL Tagungsbericht, Klagenfurt: pages: 685-689.

Boersma, M. (2000): The nutritional quality of P-limited algae for *Daphnia.* Limnol. *Oceanogr.,* 45(5): 1157–1161.

Bouchnak, R., (2009): Differentieller Einfluss der Grünalge Pseudokirchneriella subcapitata und anderer Futterqualitäten auf die Lebens-parameter von *Daphnia magna* STRAUS in Abhängigkeit von chemischem Stress durch HuminFeed® Masterarbeit. BTU Cottbus.

Bouchnak R, Steinberg CEW (2010): Modulation of longevity in Daphnia magna by food quality and simultaneous exposure to dissolved humic substances. Limnologica (40): 86–91.

Brennan, S.J.; Brougham, C.A.; Roche, J.J.; Fogarty, A.M. (2006): Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. Chemosphere (64): 49-55.

Brown, M.R. (1991): The Amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. J. EXP. Mar. Bio. Ecol. (145): 79-99

Clubbs, R.L.; Brooks, B.W. (2007): *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. Ecotox. Environ. Safe. (67): 385-398.

Cowgill, U.M.; Milazzo, D.P. (1990): The sensitivity of two cladocerans to water-quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol. (120): 185–196.

DeMott, W.R. (1986): The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. Oecologia (69): 334-340.

DeMott, W.; Gulati, R. D.; Siewertsen, K. (1998): Effects of phosphorusdeficient diets on the carbon and phosphorus balance of *Daphnia magna.* Limnol. Oceanogr. (43): 1147–1161.

DIN EN ISO 6878 (2004): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Phosphor - Photometrisches Verfahren mittels Ammoniummolybdat (ISO 6878:2004); Deutsche Fassung.

Dodson, S. I.; D. G. Frey, (2001): Cladocera and other Branchiopoda. In Thorp, J. H. & Covich, A. P. (eds), Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, 2nd edn. Academic Press, San Diego, San Francisco: 849–913.

Elmoor-Loureiro, L.M.; Santangelo, J.M.; Lopes, P.M.; Bozelli, R.L. (2010): *A new report of* Moina macrocopa (Straus, 1820) (Cladocera, Anomopoda) in South America, Braz. J. Biol. (70): 225–226.

Euent, S.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.W. (2008): Gender-specific lifespan modulation in *Daphnia magna* by dissolved humic substances preparation. Ann. Environ. Sci. (2): 7–10.

Ferrão-Filho, A.S.; Fileto, C.; Lopes, N.P.; Arcifa, M.S. (2003): Effects of essential fatty acids and N and P-limited algae on the growth rate of tropical cladocerans. Freshwat. Biol. (48): 759–767.

Frost, P.C.; Ebert, D.; Larson, J.H.; Marcus, M.A.; Wagner, N.D.; Zalewski, A. (2010): Transgenerational effects of poor elemental food quality on *Daphnia magna*. Oecologia (162): 865–872.

Geller, W.; Müller, H. (1981): The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. Oecologia (49): 316– 321.

Gems, D.; McElwee, J. J. (2003): Microarraying mortality. Nature (News and Views) (424): 259-260.

Glazier, D.S. (1992): Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna*. Ecology (73): 910-926.

Goulden, C.E.; Moeller, R.E.; Mcnair, J.N.; Place, A.R. (1999): Lipid dietary dependencies in zooplankton. In: Arts, M.T. & Wainman B.C. (Hrsg.): Lipids in freshwater ecosystems. Springer (New York) 91-108.

Gulati, R.D.; DeMott, W.R. (1997): The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities. Freshwat. Biol. (38): 753-768.

Gyllström, M.; Hansson, L. A. (2004): Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. Aquat. Sci. (66): 274- 295.

Hebert, P.D.N. (1981): Obligate asexuality in *Daphnia*. Am. Nat. (117): 784-789.

Hebert, P.D.N; Beaton, M.J.; Schwartz, S.S.; Stanton, D.J. (1989): Polyphyletic origins of asexuality in *Daphnia pulex*. I. Breeding-system variation and levels of clonal diversity. Evolution (43): 1004–1015.

Hegewald, E. (2000): New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). Archiv für Hydrobiologie, Suppl. (96): 1-18.

Hessen, D.0. (1989): Factors determining the nutritive status and production of zooplankton in a humic lake. J. Plankton Res. 11: 649-664.

Hessen, D.O. (1992): Nutrient element limitation of zooplankton production. American Naturalist (140):799–814.

Jones, R.I. (1992): The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. Hydrobiologia (229): 73-91.

Kampkötter, A.; Timpel, C.; Zurawski, R.F.; Ruhl, S.; Chovolou, Y.; Proksch, P., Wätjen, W. (2008): Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. Comp. Biochem. Physiol. Part B (149): 314–323.

Kaneko, G.; Yoshinaga,T.; Yanagawa, Y.; Ozaki, Y.; Tsukamoto, K.; Watabe, S. (2011): Calorie restriction-induced maternal longevity is transmitted to their daughters in a rotifer. Functional Ecology (25): 209–216.

Kirkwood, T.B. (1977): Evolution of ageing. Nature (270): 301–304.

Kirkwood, T.B.L.; Austad, S.N. (2000): Why do we age? Nature 408, 233–238.

Klüttgen, B.; Dülmer, U.; Engels, M.; Ratte, H. (1994): ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. Water Res. (28): 743–746.

Knisely, K.; Geller, W. (1986): Selective feeding of four zooplankton species on natural lake phytoplankton. Oecologia (69): 86-94.

Koch, U. (2009): Resting egg production in *Daphnia*: food quality effects and clonal differences. Dissertation. Universität Konstanz.

Koch, U.; von Elert, E.; Straile, D. (2009): Food quality triggers the reproductive mode in the cyclical parthenogen *Daphnia* (Cladocera). Oecologia (159): 317–324.

Kohl, J.G; Nicklisch, A. (1988): Ökophysiologie der Algen, Wachstum und Ressourcennutzung. Akademie-Verlag Berlin.

Lampert, W. (1978): A Field Study on the Dependence of the Fecundity of *Daphnia* spec. on Food Concentration. Oecologia (36): 363-369.

Lampert, W. (1987): Laboratory studies on zooplankton – cyanobacteria interactions. N Z J Mar. Freshwat. Res. (21): 483-490.

Lampert, W., (1993): Ultimate causes of diel vertical migration of zooplankton: New evidence for the predator-avoidance hypothesis. Ergeb. Limnol. (39): 79–88.

Lampert,W.; Tollrian, R.; Stibor, H. (1994): Chemische Induktion yon Verteidigungsmechanismen bei Süßwassertieren. Naturwissenschaften (81): 375-382.

Lampert, W.; Sommer, U. (2007): Limnoecology. The Ecology of Lakes and Streams. Oxford Univ. Pr., Oxford, 2, 336 pp.

Leenheer, J.A.; Rostad, C.E. (2004): Tannins and terpenoids as major precursors of Suwannee River fulvic acids. US. Geol. Surv. Sci. Invest. Report: 1004–5276.

Looser, P.W.; Bartschi, S.: Fent K. (1998): Bioconcentration and bioavailability of organotin compounds: influence of pH and humic substances. Appl. Organometal. Chem. (12): 601–611.

Mano, H.; Sakamoto, M.; Tanaka, Y. (2010): A Comparative Study of Insecticide Toxicity and Body Size among Seven Cladoceran Species. Ecotoxicology (19): 1620 1625.

Martin-Creuzburg, D.; Wacker, A.; von Elert, E. (2005): Life history consequences of sterol availability in the aquatic keystone species *Daphnia*. Oecologia (144): 362-372.

Martin-Creuzburg, D.; Von Elert, E. (2009): Good food versus bad food: the role of sterols and polyunsaturated fatty acids in determining growth and reproduction of Daphnia magna. Aquat. Ecol**.** **(**43): 943–950.

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.

Meems, N.; Steinberg, C.E.W.; Wiegand, C. (2004): Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna)* by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin. Sci. Total. Environ. (319): 123–136.

Meinelt, T.; Paul, A.; Phan, T.M.; Zwirnmann, E.; Krüger, A.; Wienke, A.; Steinberg, C.E.W. (2007): Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substances of different qualities. Aquat. Toxicol. (83): 93–103.

Mohr, S.; Adrian, R. (2002): Reproductive success of the rotifer Brachionus calyciflorus feeding on ciliates and flagellates of different trophic modes. Freshwat. Biol. (47): 1832–1839.

Moore, S. (1968): Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. J. Biol. Chem. 243(23): 6281-6283.

Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann,C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon,C. (2003): Genesthatactdownstream of DAF-16toinfluencethe lifespan of Caenorhabditis elegans. Nature (424): 277–284.

Müller-Navarra, D. (1995a): Evidence that a highly unsaturated fatty acid limit *Daphnia* growth in nature. Arch. Hydrobiol. (132): 297–307.

Müller-Navarra, D.C. (1995b): Biochemical versus mineral limitation in daphnia. Limnol. Oceanogr (40): 1209-1214

Nandini, S.; Mayeli, S.M.; Sarma, S.S.S. (2004): Effect of stress on the life-table demography of Moina macrocopa. Hydrobiologia (526): 245–254.

Nicklisch, A.; Shatwell, T.; Köhler, J. (2008): Analysis and modelling of the interactive effects of temperature and light on phytoplankton growth and relevance for the spring bloom. J. Plankton Res. (30): 75-91.

Nygaard, G.; Komarek, J.; Kristiansen. J.; Skulberg, O.M. (1986): Taxonomie designations of the bioassay alge NIVA-CHL 1 “Selenastrum capricornutum” and som related strains. Opera. Botanica. 90.

OECD (1998): Guidelines for testing of chemicals, no. 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. Organisation for Economic Cooperation and Development (Paris, Frankreich).

Oikari, A.; Kukkonen, J.; Virtanen, V. (1992): Acute toxicity of chemicals to Daphnia magna in humic waters. Sci. Total. Envir. (117/118): 367-377.

Olsen, Y.; Varum, K. RI.; Jensen, A. (1986): Dependence of the rate of Release of phosphorous by zooplankton on the C : P ratio in the food supply, as calculated by a recycling model. Limnol. Oceanogr. 31: 34-44.

Patil, V.; Källqvist, T.; Olsen, E.; Vogt, G.; Gislerød, H.R. (2007): Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquacult Int (15): 1–9.

Parsons, P. (1995): Inherited stress resistance and longevity: a stress theory of ageing. Heredity (75): 216-221.

Petersen, R.C.; Persson, U. (1987): Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions, Sci. Tot. Environm. (62): 387–398.

Pietrzak, B.; Grzesiuk, M.; Bednarska, A. (2010): Food quantity shapes life history and survival strategies in Daphnia magna (Cladocera). Hydrobiologia (643): 51–54.

Potgeter, H. (1998): Entwicklung und Anwendung eines neuartigen Analysenverfahrens zur Bestimmung quecksilberorganischer Verbindungen in Sedimenten mit Hilfe eines gekoppelten SFC-AFS Systems. Dissertation. Universität Hamburg.

Porter, K. G.; Orcutt, J. D.; Jr. ; Gerritsen, J. (1983): Functional Response and Fitness in a Generalist Filter Feeder, *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea). Ecology, Vol. 64, No. 4: 735-742.

Rothhaupt, K.O. (1988): Mechanistic resource competition theory applied to laboratory experiments with zoplankton. Nature (333): 660-662.

Sánchez, M.; Ferrando, M.D.; Sancho, E.; Andreu, E. (2000): Physiological Perturbations in Several Generations of Daphnia magna Straus Exposed to Diazinon. Ecotox. Environ. Safe. (46): 87-94.

Sánchez, M.; Andreu-Moliner, E.; Ferrando, M.D. (2004): Laboratory investigation into the development of resistance of Daphnia magna to the herbicide molinate. Ecotox. Environ. Safe. (59): 316–323.

Sarma, S. S. S.; Nandini, S. (2006): Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. J Environ Sci Health B. 41(8):1417-30.

Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.W. (2008): Quercetinmediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? Mech. Ageing Develop. (129): 611–613.

Selye H. (1970): Stress and aging, Journal of the American Geriatrics Society, (18): 669 – 680

Spaak, P. (1995): Sexual reproduction in *Daphnia*: interspecific differences in a hybrid speciescomplex. Oecologia (104): 501-507.

Steinberg, C.E.W. (2003): Ecology of humic substances in freshwaters. Springer, Berlin.

Steinberg, C.E.W.; Paul, A.; Pflugmacher, S.; Meinelt, T.; Klöcking, R.; Wiegand, C. (2003): Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – A review. Fresenius Environ. Bull. (12)**:** 391–401.

Steinberg, C.E.W.; Höss, S.; Kloas, W.; Lutz, I.; Meinelt, T.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C. (2004): Hormone-like effects of humic substances on fish, amphibians, and invertebrates. Environmental Toxicology (19): 409–411.

Steinberg, C.E.W.; Kamara, S.; Prokhotskaya, V.Yu.; Manusadžianas, L.; Karasyova, T.; Timofeyev. M.A.; Zhang, J.; 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? Freshwat. Biol. (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 lifespan of Caenorhabditis elegans. Ann. Environ. Sci. (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. Environ. Sci. Poll. Res. (15): 128–135.

Steinberg, C.E.W.; Menzel, R. (2009): Huminstoffe - totes Material höchst aktiv. Studien über lebenswichtige braune Geopolymere. 1. Wirbellose Tiere. Aquaristik Fachmagazin (205): 64-69.

Steinberg, C.E.W., Ouerghemmi, N., Herrmann, S., Bouchnak, R., Timofeyev, M.A., Menzel, R. (2010a): Stress by poor food quality and exposure to humic substances: *Daphnia magna* responds with oxidative stress, lifespan extension, but reduced offspring numbers. Hydrobiologia (652): 223-236.

Steinberg, C.E.W., Vicentic, L., Rauch, R., Bouchnak, R., Suhett, A.L., Menzel, R. (2010b): Exposure to humic material modulates life history traits of the cladocerans, *Moina macrocopa* and *M. micrura*. Chem. Ecol. 26:4, 135-143.

Sterner, R.W. (1993): *Daphnia* growth on varying quality of Scenedesmus: mineral limitation of zooplankton. Ecology (74): 2351-2360.

Sterner, R.W.; Hagemeier, D.D.; Smith, W.L.; Smith, R.F. (1993): Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia.* Limnol Oceanogr (38): 857-871.

Sterner R.W.; Hessen, D.O. (1994): Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. Annu Rev Ecol Syst 25: 1–29.

Sterner, R.W.; Elser, J.J. (2002): Ecological stoichiometry. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.

Suhett, A.L., Steinberg, C.E.W., Santangelo, J.M. Bozelli, R.L., Farjalla, V.L. (2011): Natural dissolved humic substances increase lifespan and resistance to salt stress in the cladoceran *Moina macrocopa*. Environ Sci Pollut Res. DOI 10.1007/s11356-011 0455-y.

Suhett A.L., MacCord F., Amado A.M., Farjalla V.F. & Esteves F.A. (2004) Photodegradation of dissolved organic carbon in humic coastal lagoons (RJ, Brazil). In: Humic Substances and Soil and Water Environment (Eds L. Martin-Neto, D.M.B.P. Milori & W.T.L. da Silva), pp. 61–63. Embrapa, São Carlos, Brazil.

Sundbom, M.; Vrede, T. (1997): Effects of fatty acid and phosphorus content of food on the growth, survival and reproduction of *Daphnia.* Freshwat. Biol. (38): 665- 674.

Szyf M. (2009): Dynamisches Epigenom als Vermittler zwischen Umwelt und Genom. medgen (21): 7–13.

Thurman, E.M. (1985): Organic Geochemistry of Natural Waters. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Kolesnichenko, A.V., Bedulina, D.S., Kolesnichenko, V.V., Pflugmacher, S., Steinberg, C.E.W. (2006a): Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *G. tigrinus* (Sexton). Sci. Total Environ. (366): 673–681.

Urabe, J.; Clasen, J.; Sterner, R.W. (1997): Phosphorus limitation of Daphnia growth: Is it real? Limnol. Ocermogr. 42(b): 1436-1443.

Urabe, J.; Sterner, R.W. (1996): Regulation of herbivore growth by the balance of light and nutrients. Proc Natl Acad Sci (93): 8465–8469.

Urabe, J.; Watanabe, Y. (1992): Possibility of N or P- limitation for planktonic cladocerans: an experimental test. Limnol. Oceanogr. (37): 244–251.

Van Den Hock, C. (1978) Algen. Thieme, Stuttgart.

Vandegehuchte, M.B.; Kyndt, T.; Vanhome, B.; Haegeman, A.; Gheysen, G.; Janssen, C.R. (2009): Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. Environ. Intern. (35): 700–706.

Vandegehuchte, M.B.; Lemière, F.; Vanhaecke,L.; Vanden Berghe, W.; Janssen, C.R. (2010): Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. Comp. Biochem. Physiol. C. (151): 278–285.

Vanni, M.J.; Lampert, W. (1992): Food quality effects on life history traits and fitness in the generalist herbivore *Daphnia.* Oecologia (92): 48-57.

Vollmer, C. (1960): Wasserflöhe. A. Ziemsen Verlag. Wittenberg Lutherstadt. 3. unveränderte Auflage.

Von Elert, E (2002): Determination of limiting polyunsaturated fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. Limnol. Oceanogr. 47(6): 1764–1773.

Vrede, T.; Dobberfuhl, D.; Kooijman, S.A.L.M.; Elser, J. J. (2004): Fundamental Connections Among Organism C:N:P Stoichiometry, Macromolecular Composition, and Growth. Ecology 85(5): 1217–1229.

Vrede,T.; Persson, J.; Aronsen, G.(2002): The influence of food quality (P :C ratio) on RNA:DNA ratio and somatic growth rate of *Daphnia*. Limnol. Oceanogr., 47(2): 487–494.

Wetzel, R.G. (2001): Limnology. Lake and River Ecosystems. 3rd ed. Academic Press.

Windemuth, D.; Nentwig, Ch.G; Raatz, U. (1992): Eine kurze Formel zur Berechnung von partiellen Multiplen Korrelationen. Biom. J. (34): 639-641.

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.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Cottbus, den 14.06. 2011

Rihab Bouchnak