



Differentieller Einfluss der Grünalge *Pseudokirchneriella* subcapitata und anderer Futterqualitäten auf die Lebensparameter von *Daphnia magna* STRAUS in Abhängigkeit von chemischem Stress durch HuminFeed<sup>®</sup>

## Masterarbeit

im Studiengang Landnutzung und Wasserbewirtschaftung
Fakultät 4 für Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik an der
Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus

Vorgelegt von

Diplom Zoologin Rihab Bouchnak

Aus Aleppo / Syrien

Matrikelnummer: 2503706

Betreut von

Prof. Dr. B. Nixdorf, BTU Cottbus

Prof. Dr. C. E.W. Steinberg, Humboldt-Universität zu Berlin

Cottbus, den 30.04.09

Meinen Eltern Aziza und Mohamed

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. C. E. W. Steinberg (Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biologie, Arbeitgruppe Gewässer- und Stressökologie), der mich durch seine Vorlesungen erst auf den "Geschmack" gebracht hat, Stressökologie zu studieren. Für Seine Themenstellung, die Betreuung und der Begutachtung der Masterarbeit bin ich sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. B. Nixdorf (Lehrstuhl Gewässerschutz, BTU Cottbus) danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Auch Frau B. Körner (Leiterin des Akademischen Auslandsamts, BTU Cottbus) und ihrer Kollegin Frau J. Wagler sei für ihre freundliche Kooperation gedankt.

Prof. Dr. W. Lampert (Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie in Plön) danke ich für die schnellen Rückmeldungen meiner E-Mails und die wertvollen Beantwortungen meiner Frage (beim Dauereier-Auftreten).

Die Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Gewässer- und Stressökologie war von großer Hilfsbereitschaft geprägt. Hier gilt mein spezieller Dank Frau G. König für ihre moralische Unterstützung (steter Tropfen höhlt den Stein!!). Für die gute Zusammenarbeit danke ich auch Steffen, Nadia und Laura.

Mein besonderer Dank gilt Ramona Rauch für ihre ständige Hilfsbereitschaft nicht nur bei der Sprachkorrektur der Arbeit, sondern auch in menschlichen Belangen. Herzlichen Dank!!

Mein Dank gilt der Aleppo-Universität, die mir das Stipendium gewährten und mir das Studium in Deutschland ermöglicht.

Zutiefst zu Dank verpflichtet bin ich meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich nicht nur während der Masterarbeit, sondern während meines gesamten Studiums tatkräftig unterstützt und ermutigt haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich auch bei meiner kleinen Familie (Hasan, Abdulrahman und Batoul) für die liebvolle Unterstützung während der nicht immer leichten Zeit der Anfertigung meiner Masterarbeit. Für alle war das Schreiben an der Masterarbeit ein nervender Prozess, der Feiertage und Wochenenden in Anspruch genommen hat.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinem Mann Hasan, der mich so intensiv in "stressigen" Stunden unterstützt hat und mir soviel Liebe und Kraft gegeben hat. Ohne Dich hätte ich das hier nicht machen können!!

Auch all denen, die hier nicht namentlich genannt wurden, gilt mein herzlicher Dank.

## Inhaltverzeichnis

Abk	ürzungen	6
Zus	ammenfassung	7
1	Einleitung1	0
2	Material und Methoden1	8
2.1	Übersicht1	8
2.2	Daphnia magna als Versuchsorganismus1	9
2.3	Herkunft der Versuchstiere2	<u>'</u> 1
2.4	Haltung und Aufzucht der Versuchstiere2	:1
2.5	Huminstoff2	2
2.6	Futterqualitäten2	:4
2.7	Experimentelles Design	:1
2.8	Datenerhebung3	2
2.9	Statistische Datenauswertung3	4
3	Ergebnisse3	6
3.1	Ergebnisse zum Verhalten von D. magna bei Fütterung mit de	r
Mikr	ogrünalge <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 3	6
3.2	Ergebnisse zum Verhalten von D. magna bei Fütterung mit de	r
Bäc	kerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3	9
3.3	Ergebnisse zum Verhalten von D. magna bei Fütterung mit de	ŗ
Bäc	kerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> plus Vitamin C4	.3
3.4	Zusätzlicher Vergleich4	.7
4	Diskussion5	2
5	Schlussfolgerung6	3

6	Literatur- und Quellenverzeichnis	65
An	nhang	79
Se	elbständigkeitserklärung	82

## Abkürzungen

ADaM	Aachener Daphnien Medium
ANOVA	One Way <b>An</b> alyse <b>o</b> f <b>Va</b> riance (einfaktoriellen Varianzanalyse)
DAF-16	Transkriptionsfaktor
DOC	<b>d</b> issolved <b>o</b> rganic <b>c</b> arbon (gelöster organischer Kohlenstoff)
HF	HuminFeed <sup>®</sup>
HSP	heat shock protein
IGF-1	insulin/insulin-like growth factor
MW	Mittelwert
NK	Nachkommen
PS	Mikrogrünalge <b>P</b> seudokirchneriella <b>s</b> ubcapitata
PUFAs	<b>p</b> oly <b>u</b> nsaturated <b>f</b> atty <b>a</b> cids (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
ROS	reactive oxygen species (reaktiven Sauerstoff-Spezies)
SEM	Standard Error of The Mean
V.C	Vitamin C (Ascorbinsäure)

## Zusammenfassung

Die Lebensparameter von *Daphnia* spec. sind von verschiedenen biotischen und abiotischen Faktoren abhängig. Die vorliegende Arbeit widmet sich der Untersuchung der Effekte des Huminstoffpräparates HuminFeed<sup>®</sup> auf die Fruchtbarkeit und die Lebensdauer des Zooplankters *Daphnia magna* STRAUS in Abhängigkeit von der Futterqualität. *D. magna* ist in verschiedenen biologischen und ökologischen Forschungseinrichtungen als Modellorganismus wegen seiner in dieser Arbeit noch erwähnten praktischen Vorteile geeignet.

HuminFeed<sup>®</sup> wurde in drei Konzentrationen (0 (Kontrolle), 0.04 und 0.9 mmol/l DOC) verwendet. Da Einfluss der Futterqualität untersucht werden sollte, wurden die Versuchstiere entweder mit einer Algensuspension der Mikrogrünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* (Koršikov) Hindák oder mit 0.05 g/l von Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen) oder mit Bäckerhefe (0.05 g/l) plus 2 mg/l Ascorbinsäure (Vitamin C) gefüttert.

Mikrogrünalge *P. subcapitata* ist in verschiedenen Studien als eine gute Nahrungsqualität des Zooplanktons beschrieben, während Bäckerhefe als ein schlechtes Futter bekannt ist. Wenn die Nahrung der exponierten Organismen spontane Antioxidanzien, wie zum Beispiel Vitamin C, enthält, könnten die Organismen den Stress besser kompensieren. Daher wurde in dieser Arbeit erwartet, dass Lebensdauer und Fruchtbarkeit von *D. magna* bei Fütterung mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata* am besten und bei Fütterung mit Bäckerhefe am meisten beeinträchtigt wären. Wenn die Versuchstiere mit Bäckerhefe plus Vitamin C gefüttert wurden, würde erwartet, dass diese Futterqualität zwischen den anderen beiden Futterqualitäten bewertet würde.

Es ist schon in mehreren Studien nachgewiesen, dass HuminFeed<sup>®</sup> Stress auslösen kann. Ausgehend von dieser Aussage wurde vermutet, dass

Futtermangel bzw. schlechte Futterqualität als zweiter Stressor den durch HuminFeed<sup>®</sup> verursachten Stress erhöhen würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Reproduktions-Test und ein Lebensdauer-Test mit neugeborenen Versuchstieren (≤ 24 h) der Art *D. magna* durchgeführt.

Populationsrelevante Parameter von *D. magna* (Fruchtbarkeit und Lebensdauer) wurden untersucht. Jeden Tag wurde die Anzahl der toten Versuchstiere protokolliert (Überlebenstest). Alle zwei Tage wurden die Versuchstiere in frisches künstliches Medium ADaM mit entsprechendem Futter und zu testender HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration umgesetzt. Bei der Umsetzung wurde die Anzahl der Nachkommen protokolliert (Reproduktionstest).

Die Auswertung der Resultate zeigte, dass die Nahrungsqualität die Gelegegröße von *D. magna* bestimmt. Mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata* gefütterte Versuchstiere erreichten signifikante Erhöhungen Reproduktionsrate im Vergleich zu den mit Bäckerhefe (mit oder ohne Vitamin C) gefütterten Versuchstieren. Zwischen den mit Bäckerhefe gefütterten Versuchstieren und denjenigen, die mit Bäckerhefe plus Vitamin C gefüttert wurden, gab es kaum Unterschiede. Vermutet wird, dass entweder HuminFeed® photolytisch abgebaut wird und dadurch ROS (reactive oxygen species) gebildet werden. Dann hätte Vitamin C als Radikalfänger die im Medium gebildeten ROS statt die unter HuminFeed®-Stress im Körper der Versuchstiere gebildeten ROS gefangen (bei Fütterung mit Bäckerhefe plus Vitamin C). Oder die in Bäckerhefe vorkommende Ascorbinsäure dieses Ergebnis erklären könnte (bei Fütterung mit Bäckerhefe ohne Vitamin C). Das heißt, dass die Zugabe von Ascorbinsäure mit einer Konzentration von 2 mg/l die Futterqualität der Bäckerhefe nicht verbessert hat.

Bei Fütterung mit Bäckerhefe oder mit Bäckerhefe plus Vitamin C konnte nachgewiesen werden, dass bei Zugabe von HuminFeed<sup>®</sup> mit einer Konzentration von 0.9 mmol/l DOC eine signifikante Verlängerung der

Lebensdauer von *D. magna* verursachen konnte. Anhand der *Disposable Soma Theory of Ageing* wurde die Ergebnisse des Lebensdauertests diskutiert. Es wurde auch versucht, die aktuelle Paradigmen zur Alterung z. B. *Green Theory of Ageing* auf die gewonnenen Ergebnisse anzuwenden und zu diskutieren.

Weiterhin konnte HuminFeed<sup>®</sup> die Fruchtbarkeit der Versuchstiere auf Bäckerhefe und Bäckerhefe plus Vitamin C signifikant verbessern. Dabei könnte HuminFeed<sup>®</sup> als Nahrung aufgenommen werden.

Bei Fütterung mit Bäckerhefe oder mit Bäckerhefe plus Vitamin C traten interessanterweise Ephippien ohne vorausgehender Produktion von Männchen auf. Bei Fütterung mit Bäckerhefe verringerte der HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz mit einer Konzentration von 0.9 mmol/l signifikant die Zahl der Ephippien pro Weibchen und Tag. Die Versuchstiere auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* produzierten keine Ephippien. Da das Auftreten von Ephippien ein Stressindikator ist, kann man davon ausgehen, dass Bäckerhefe als Stressor durch ihre schlechte Futterqualität zur Ephippien-Produktion führte.

## 1 Einleitung

Daphnia magna STRAUS (1820) gehört zur Ordnung der Cladocera (zur Taxonomie von *D. magna* siehe Tabelle 1). Cladoceren, insbesondere *Daphnia*, gehören weltweit zur wichtigsten Gruppe von Zooplanktern in Süßgewässern. Ihre Verbreitung reicht von arktischen Tümpeln über Bergseen bis hin zu tropischen Seen. Obwohl hauptsächlich im Süßwasser vertreten, kommen einige Arten auch in brackigen Gewässern vor (Lampert & Rothhaupt 1991).

Tabelle 1: Taxonomie von D. magna STRAUS<sup>1</sup>

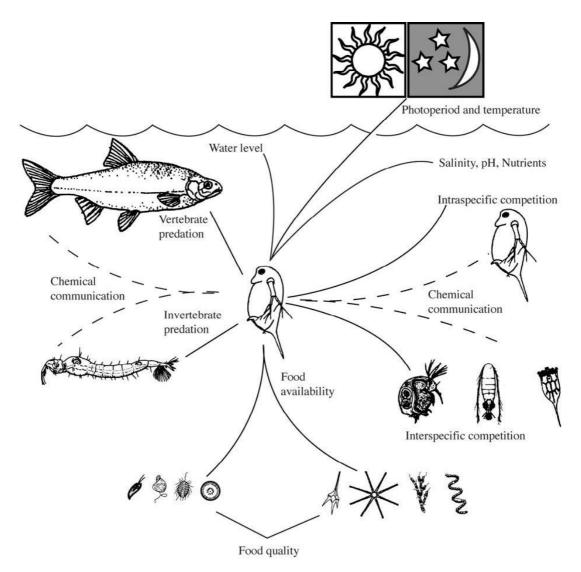
#### **Biota**

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 – arthropodas Subphylum Crustacea Brünnich, 1772 - crustaceans Class Branchiopoda Latreille, 1817 - branchiopods Subclass Phyllopoda Preuss, 1951 Order Diplostraca Gerstaecker, 1866 Suborder Cladocera Latreille, 1829 - cladocerans Infraorder Anomopoda Stebbing, 1902 Family Daphniidae Straus, 1820 Genus Daphnia TM O.F. Müller, 1785 Art Daphnia magna Straus, 1820

Die Verteilung und das Vorkommen einer Population werden durch verschiedene Faktoren limitiert. Die Lebensparameter von *Daphnia* spec. werden durch abiotische Faktoren wie z. B. Wassertemperatur, Lichtverhältnisse (z. B. Berberovic et al. 1990; Straile & Geller 1998;

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Klassifikation von *D. magna* ist bei: Systema Naturae 2000 unter: http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=33105

Alekseev & Lajus 2009), pH-Wert, Sauerstoffvorkommen (z. B. Krause-Dellin & Steinberg 1986) und chemische Substanzen wie z. B. Huminstoffe (z. B. Meems et al. 2004; Steinberg et al. 2006; Euent et al. 2008) bestimmt. Biotische Faktoren wie z. B. quantitative and qualitative Eigenschaften der Nahrung (Geller 1975; Geller & Müller 1981; Rohrlack et al., 1999) sowie Konkurrenz um die Nahrungsquellen (Gyllström & Hansson 2004) und Prädation von Wirbeltieren und Wirbellosen (Lampert 1993) beeinflussen ebenfalls die Lebensparameter. Abbildung 1 soll diese Faktoren verdeutlichen.



**Abbildung 1:** Allgemeine Einflussfaktoren auf Wachstum, Reproduktion und Mortalität von *Daphnia* im Nahrungsnetz. Grafik aus Gyllström &Hansson (2004).

Daphnia kann sich in Ökosystemen relativ erfolgreich behaupten. Das beruht

dabei vor allem auf ihrer Fortpflanzungsweise: Daphnien pflanzen sich in der Regel über Parthenogenese fort. Der Vorteil dieser asexuellen Reproduktion ist die Maximierung des Populationswachstums. Unter bestimmten Bedingungen wechseln die zyklisch parthenogenetischen Daphnien von der asexuellen zur sexuellen Reproduktion (Abbildung 2).

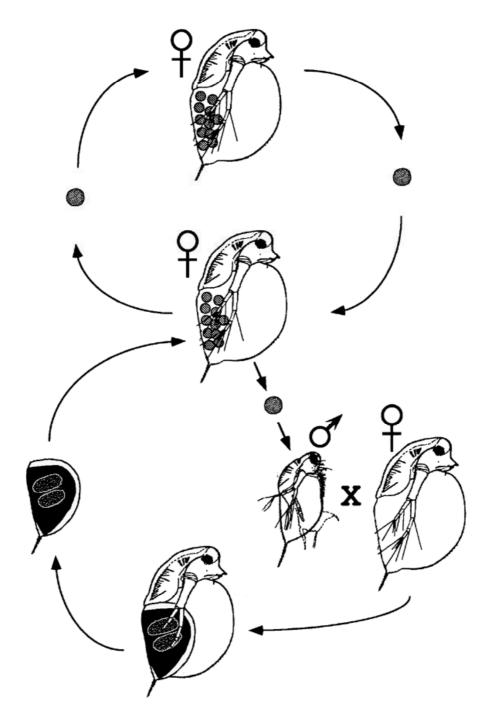


Abbildung 2: Lebenszyklus von Daphnia. Grafik aus Limburg (2000).

Die Veränderung der Reproduktionsweise der parthenogenetischen Weibchen zu bisexueller Fortpflanzung wird durch verschiedene Signale aus der Umwelt induziert (Alekseev & Lampert 2001). Ungünstige Umweltbedingungen in einem Habitat, wie z. B. niedrige Temperatur, kurze Photoperiode, Nahrungsknappheit (Hobæk & Larsson 1990); hohe Populationsdichten, Prädation (Ślusarczyk 1995); konzertierte Aktion der Licht- und chemische Signale (Ślusarczyk et al. 2005), können diesen Wechsel initiieren. Aus den parthenogenetischen Eiern entwickeln sich dann auch männliche Nachkommen. Nach der Paarung entsteht über dem Brutraum eines weiblichen Wasserflohs ein sattelförmiges Gebilde (Ephippium), das zwei Dauereier enthält.

Die Dauereier sind äußerst widerstandsfähig und können zum Beispiel Kälte oder Hitze und Trockenheit gut überstehen. Sie können ins Sediment absinken, um dort Perioden ungünstiger Lebensbedingungen zu überstehen und viele Jahre überleben, um sich beim günstigeren Bedingungen zu neuen Weibchen zu entwickeln. Die Dauereier, die nicht ins Sediment absinken, sondern auf der Wasseroberfläche treiben, können z. B. durch Wasservögel oder auch Schiffe verbreitet werden (Limburg 2000). Bestimmte Reize, wie zum Beispiel Temperatur, zunehmende Tageslänge oder hohe Sauerstoffkonzentrationen führen dazu, dass die Dauereier sich entwickeln und die Daphnien schlüpfen können (Schwartz & Hebert 1987).

Nur wenige *Daphnia*-Arten sind in der Lage ohne Männchen Dauereier zu produzieren (Vollmer 1960, Hebert 1981) wie z. B. *Daphnia pulex* und *Daphnia pulicaria* (Prof. W. Lampert, persönliche Mitteilung per E-Mail).

Aufgrund der parthenogenetischen Fortpflanzungstrategie können Daphnien leicht als Klone kultiviert werden. Das hat sie zu einem überaus interessanten Modellorganismus in der aquatischen Ökologie gemacht. Der Wasserfloh *Daphnia* ist bereits Gegenstand biologischer Forschung von verschiedensten Forschungseinrichtungen und hat in der Wissenschaft einen hohen Stellenwert.

Ein **interessanter Aspekt**, dem viel Aufmerksamkeit geschenkt wird, ist die Auswirkung der Futterqualität auf Lebensparameter von *Daphnia*-Arten. Zum Einfluss der Futterqualität auf die Fitness von Daphnien stehen viele Studien zu Verfügung (z. B. Ahlgren 1990, Urabe et al. 1997, DeMott et al. 1998, Michels & De Meester 1998, Hessen 1990, Hansen et al. 2008).

Die Nahrungsaufnahme bei Daphnien erfolgt mit Hilfe des von Thoracopoden und Carapax gebildeten Filterapparats (Fryer 1991). Durch den Thoracopodenschlag wird eine Strömung erzeugt und suspendierte Partikel werden an den Filterflächen der 3. und 4. Thoracopodenpaare zurückgehalten. Der Prozess der Partikelretention kann dabei mit dem einer Saug-Druck-Pumpe verglichen werden, wobei das Wasser über einen Filter gesaugt wird. Daphnien filtrieren ihre Nahrung aus der Wassersäule. DeMott zeigte 1986, dass Daphnien ihre Nahrung nicht nach Qualität selektieren können. Dies gilt zumindest für kleine Partikel. Die Nahrungsaufnahme wird durch die Morphologie des Filterapparates bestimmt.

Qualitätsbestimmende Eigenschaften sind neben Größe und Form der potenziellen Nahrungspartikel auch deren Toxizität. Besonders von Cyanobakterien kann eine toxische Wirkung auf Daphnien ausgehen (z. B. Lampert 1987). Aber auch für einen Stamm der Grünalge *Scenedesmus* wird von Boersma & Vijverberg (1994) eine toxische Wirkung auf Daphnien in Betracht gezogen. In verschiedenen Studien (z. B. Gulati & DeMott 1997; Sterner 1993) wurden drei weitere Nahrungsqualitätsfaktoren in den Mittelpunkt des Interesses und der Forschung gerückt:

- 1) Die Verdaubarkeit der Nahrung, speziell des Phytoplanktons.
- 2) Verfügbarkeit chemischer Elemente, vor allem des Phosphors.
- 3) Verfügbarkeit biochemischer Moleküle, vor allem der Fettsäuren.

Ein **anderer interessanter Aspekt**, in dem *Daphnia* als Testorganismus genutzt wurde, ist der Einfluss von chemischen Substanzen auf Lebensparameter von *Daphnia*-Arten. Dazu gibt es unzählige Versuche und Ansätze von unterschiedlichsten Wissenschaftlern (z. B. Shurin & Dodson 1997; Flaherty & Dodson 2005; Olmstead & LeBlanc 2007). Zur Betrachtung

der Auswirkung von Huminstoffen auf *D. magna* gibt es nur wenige Studien (Meems et al. 2004; Schmidt et al. 2005, 2006; Euent et al. 2008; Ouerghemmi 2009). Die Überprüfung der Auswirkung eines Huminstoffes auf *D. magna* ermöglicht es auch, Aussagen über dessen Wirkung auf die aquatische Umgebung zu machen und Vergleiche zur Empfindlichkeit einer bzw. mehrerer Arten gegenüber demselben Stoff bei unterschiedlichen Randbedingungen anzustellen.

Huminstoffe sind als Stressoren bekannt (Steinberg et al. 2008; Prokhotskaya & Steinberg 2007; Timofeyev et al. 2007). Sie 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). 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 (Steinberg et al. 2003). Diese Eigenschaften ermöglichen direkte Wechselwirkungen mit der Umwelt (Steinberg et al. 2006), die eine Vielzahl von Organismen betreffen (Steinberg 2003). 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 (Steinberg et al. 2006). Indirekt wirken die Huminstoffe zum Beispiel durch die Änderung des Lichtklimas in Gewässern oder durch ihre Funktion als externe Energie- und Nährstoffquelle aufgrund ihres Kohlenstoff- und Stickstoffanteils (siehe Steinberg et al. 2006). Nach bisherigen Erkenntnissen können die direkten Wirkungen der Huminstoffe bei Organismen Stress auslösen. Huminstoffe führen zur Aktivierung von Sauerstoff (Timofeyev et al. 2006a, 2006b; Steinberg et al. 2006, 2008; Meinelt et al. 2008) und induzieren Antistress-Reaktionen, die Energie kosten und embryotoxisch oder sogar tödlich sein könnten (Steinberg 2003; Cazenave et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund ist besonders interessant, in welchem Ausmaß die Huminstoffe (am Beispiel HuminFeed<sup>®</sup>, der durch eine alkalische Extraktion aus hoch oxydierter Braunkohle gewonnen wurde) die Lebensparameter von *D. magna* in Abhängigkeit von drei Futterqualitäten (Mikrogrünalge *Pseudokirchneriella subcapitata,* Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und Bäckerhefe plus Vitamin C) beeinflussen können. HuminFeed<sup>®</sup> kann auf unterschiedlichen Ebenen in das Leben von verschiedenen Organismen eingreifen (z. B. Meinelt et al. 2007; Steinberg et al. 2007; Claußen 2008).

Huminstoffe können als indirekte oder direkte Nahrungs- und Energiequelle dienen (Gellis & Clarke 1935; Baylor & Sutcliffe 1963; Arruda et al. 1983; Salonen & Hammar 1986). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Huminstoffe das Leben von *Caenorhabditis elegans* Maupas (Steinberg et al. 2007), männliche Wasserflöhe der Art *D. magna* Straus (Euent et al. 2008) und *Moina macrocopa* Straus (Rauch 2009) verlängern können. Auf der anderen Seite verkürzte sich die Lebensdauer der weiblichen Versuchstiere der Art *D. magna*, wenn das Medium Huminstoff enthielt (Euent et al. 2008).

Wenn die Nahrung der exponierten Organismen spontane Antioxidanzien, wie zum Beispiel Vitamin C, enthält, können die Organismen den chemischen Stress, den Huminstoffe auslösen, besser kompensieren. Es gibt erste Indikation dafür, dass die verschiedenen Futterqualitäten einen signifikanten Einfluss auf die antioxidative Reaktion der wirbellosen Wassertiere haben (Timofeyev et al. 2009).

Daher wurde in dieser Arbeit erwartet, dass Lebensdauer und Fruchtbarkeit von *D. magna* bei Fütterung mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata* am besten wären, während bei Fütterung mit Bäckerhefe am meisten beeinträchtigt wären. Wenn die Versuchstiere mit Bäckerhefe plus Vitamin C gefüttert werden, würde erwartet, dass diese Futterqualität zwischen den anderen beiden Futterqualitäten bewertet würde.

Es ist schon in mehreren Studien nachgewiesen, dass HuminFeed<sup>®</sup> Stress auslösen kann (z. B. Steinberg et al. 2006, 2008). Ausgehend von dieser

Aussage wird vermutet, dass Futtermangel bzw. schlechte Futterqualität als zweiter Stressor den durch HuminFeed<sup>®</sup> verursachten Stress erhöhen würde.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich deshalb auf die Überprüfung der Auswirkung der drei Futterqualitäten auf die Reproduktion und das Überleben vom Wasserfloh *D. magna* unter chemischen Stress ausgelöst durch HuminFeed<sup>®</sup>. Die Beobachtungen während des gesamten Lebenszyklus; die Langlebigkeit, Fruchtbarkeit, das Alter bei der ersten Reproduktion und die Zeit zwischen den Bruten wurden untersucht. All diese Parameter sind wichtig für die Beurteilung der biologischen Auswirkungen der Futterbedingungen und chemischer Substanzen im Gewässer. Damit könnten die Ergebnisse wertvolle Informationen für weitere Studien liefern.

#### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Übersicht

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Lebensparametern vom Wasserfloh *D. magna* an variablen Futterqualitäten in Anwesenheit HuminFeed<sup>®</sup>. In Rahmen dieser Arbeit wurden **neugeborene weibliche Wasserflöhe** der Art *D. magna* als Versuchstiere verwendet, die zu Beginn der Versuche ≤ 24 Stunden alt waren. Anhand der **ersten Antenne** eines Wasserflohs (Vollmer 1960) wurde unter dem Binokular (Nikon, Japan) das weibliche Geschlecht der Wasserflöhe bestimmt. Eine weitere Besonderheit ist die **Transparenz** von *D. magna*, die eine direkte Beobachtung der Eier oder Embryonenentwicklung in der **Brutkammer** eines Versuchstiers ermöglicht und damit einen Beweis für das weibliche Geschlecht eines Versuchstieres darstellt (Abbildung 3).



Abbildung 3 : Daphnia magna<sup>2</sup>

Die Untersuchungen hierzu wurden in kontrollieren Laborbedingungen durchgeführt. In den Laborexperimenten wurden zwei Aspekte der Lebensparameter in Abhängigkeit vom Futter und chemischem Stress durch HuminFeed<sup>®</sup> untersucht: die Reproduktion (Fruchtbarkeit) und das Überleben

\_

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Daphnien

(Lebensdauer ) von *D. magna* (Sterbefälle unter den Versuchstieren wurden täglich protokolliert). Andere sich auf die jeweilige Futterqualität und HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration beziehende Wirkungen auf *D. magna* (z. B. Körpergröße der Versuchstiere) wurden ebenfalls untersucht. Die Versuche dieser Arbeit liefen insgesamt ca. sieben Monaten.

#### 2.2 Daphnia magna als Versuchsorganismus

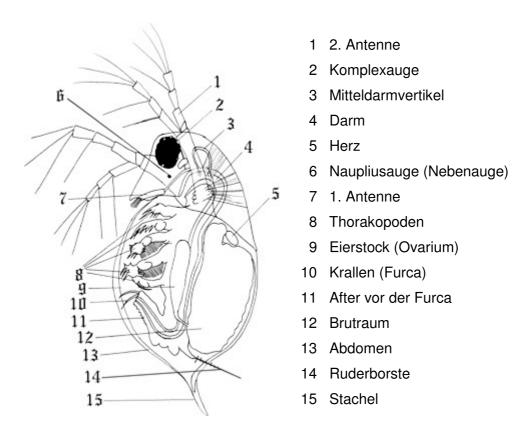
#### 2.2.1 Ökologische Bedeutung

Die Ökologie beschreibt *Daphnia* als eine Schlüsselspezies limnischer Lebensräume im Nahrungssystem eines Sees (z. B. Vanni & Lampert 1992). Daphnien haben, zusammen mit anderen herbivoren Zooplanktonarten eine große Bedeutung, da sie Phytoplankton konsumieren und selbst wieder eine wichtige Nahrungsquelle für planktivore Fische darstellen (z. B. Lampert & Sommer 1993). Dadurch stehen die Daphnien an zentraler Stelle im Nahrungsnetz limnischer Lebensräume, was das Tier für die ökologische Forschung interessant macht.

#### 2.2.2 Morphologie der Daphnien

Daphnien und damit auch *D. magna* besitzen die praktischen Vorteile eines Modellorganismus. Aufgrund ihrer geringen Größe sind Daphnien platzsparend unterzubringen, aber trotzdem gut handhabbar. In einem Größenbereich von 0.7 bis 6 mm (ohne Antennen und Stachel) sind Daphnien mit bloßem Auge gerade noch erkennbar bis gut sichtbar. Sie sind durch einen zweiklappigen, den Körper umhüllenden Panzer, der als Carapax bezeichnet wird, gekennzeichnet. Wasserflöhe besitzen fünf Paare von Blattbeinen mit Borsten und Filterkämmen, die der Nahrungsfiltration dienen. Die hängen gebliebenen Nahrungspartikel werden über eine ventrale Nahrungsrinne zur Mundöffnung transportiert. Neben der Ernährung sind die Thoracopoden auch für die Atemfunktion zuständig, während die

Schwimmbewegungen von den zweiten Antennen ausgeführt werden. Abbildung 4 zeigt diese morphologische Beschreibung.



**Abbildung 4:** Zeichnung der Morphologie von *Daphnia*<sup>3</sup>

#### 2.2.3 Reproduktionszyklus der Daphnien

Normalerweise pflanzen sich Daphnien parthenogenetisch fort, wie in der Einleitung bereits beschrieben wurde. Daphnien und damit auch *D. magna* weisen schnelle Lebenszyklen auf. Während der Parthenogenese werden nur Weibchen produziert. Die parthenogenetischen Eier entstehen durch die Unterdrückung der Meiose und sind daher genetisch identisch (Klone). Der Reproduktionszyklus beginnt mit der Häutung der Mutter. Bevor der Carapax vollständig ausgehärtet ist, werden in den Brutraum die Eier abgelegt. Mit der Eiablage beginnt die Embryonalentwicklung der Nachkommen. Wenn sie

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Quelle der Beschreibung und der Abbildung ist aus folgender Seite: http://www.cladocera.de/cladocera/cladocera.html

abgeschlossen ist, werden die Jungtiere bei der Häutung des Muttertieres aus dem Brutraum entlassen (Zaffagnini 1987). Unter günstigen Bedingungen kann ca. alle drei Tage eine neue Brut anlegt werden. Die Anzahl der Eier (Nachkommen) kann von 1 - 300 variieren und ist von der Futteraufnahme (Hebert, 1978) und dem Alter ihrer Mütter abhängig (Porter et al. 1993).

#### 2.3 Herkunft der Versuchstiere

Als Versuchstier wurde der Wasserfloh *Daphnia magna* STRAUS gewählt, der aus einem Laborklon stammte, welcher ursprünglich aus dem Umweltbundesamt Berlin bezogen wurde.

### 2.4 Haltung und Aufzucht der Versuchstiere

Die Aufzucht der Versuchstiere, sowohl in den Vorkulturen als auch in den Prüfkulturen dieser Arbeit, wurde unter kontrollierten Laborbedingungen bei konstanter, schwacher Beleuchtung und einer Temperatur von  $21\pm1$  °C durchgeführt.

Vor den eigentlichen Versuchen dieser Arbeit wurden bei den unterschiedlichen Futterqualitäten und HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen Vorkulturen angesetzt, die für mehrere Wochen aufgezogen wurden, bis genügend Weibchen vorhanden waren. Diese mussten sich alle zur selben Zeit im gleichen Embryo tragenden Stadium befinden. Um die maternalen Effekte zu minimieren, wurde erst die fünfte Generation für die Experimente verwendet.

Als Versuchsbehälter dienten neunzig Gläser mit einem Volumen von 100 ml, die mit Daphnienmedium ADaM (Klüttgen et al. 1994) inklusive der zu

testenden Futterqualität und HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration befüllt und lose mit Aluminiumfolie verschlossen wurden.

#### 2.4.1 Herstellung des Daphnienmediums (ADaM)

Das Daphnienmedium (**A**achener **D**aphnien **M**edium ADaM) wurde in sechs 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. Da für die Versuche auf Bäckerhefe plus Vitamin C (Ascorbinsäure) eine größere Säure-Pufferkapazität des Mediums benötigt wurde, wurde das ADaM mit einer veränderten NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration (ca. 10 Mal mehr) angesetzt (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Daphnienmedium ADaM (nach Klüttgen et al. 1994 modifiziert)

Chemikalien	Stammlösungen	Molarität
	(g/l)	(mol/l)
Synthetisches Meersalz	33.3	0.1
Kalziumchlorid	117.6 CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.8
Natriumhydrokarbonat	50.4 NaHCO₃	0.6
Selendioxid	0.014 SeO <sub>2</sub>	0.13

Das Daphnienmedium (ADaM) wurde gekühlt aufbewahrt und vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

#### 2.5 Huminstoff

Als Prüfhuminstoff wurde HuminFeed<sup>®</sup> (Humintech GmbH, Düsseldorf, Deutschland) ausgesucht, der durch eine alkalische Extraktion aus hoch oxydierter Braunkohle gewonnen wurde (Meinelt et al. 2007). HuminFeed<sup>®</sup>

(HF) liegt als Feststoff vor und enthält 43% organischen Kohlenstoff. HuminFeed<sup>®</sup> in gelöster Form hat eine spezifische UV-Absorption von 12.5 L mg<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup> und enthält 82.0% Huminstoffe, 18.0% niedermolekulargewicht Komponenten und 0% Polysacharide (Meinelt et al., 2007). Einflusse und Wirkmechanismen von HuminFeed<sup>®</sup> wurden in verschieden Studien schon geprüft (z. B. Steinberg et al. 2008, Euent et al. 2008). In Tabelle 3 wird die Elementaranalyse von HuminFeed<sup>®</sup> gezeigt. Eine detaillierte Beschreibung sowie die Ergebnisse der Elementaranalyse als auch der chemischen Parameter von HuminFeed<sup>®</sup> ist in Meinelt et al. 2007 zu finden.

**Tabelle 3:** Elementaranalyse von HuminFeed® in mg/g (aus Meinelt et al. 2007)

С	Н	N	S	Fe	Mn	Cu	Al	Ca	Mg
434.1	40.2	7.8	4.4	3.6	<0.1	<0.1	9.1	2.3	0.4

Die Chemische Charakterisierung von HuminFeed<sup>®</sup> zeigte, dass HuminFeed<sup>®</sup> ein Natriumsalz der Huminsäure ist<sup>4</sup>. Eine Strukturformel von HuminFeed<sup>®</sup> ist bisher nicht entwickelt worden. Er gehört aber zur Klasse der Fulvinsäure (mündliche Mitteilung Prof. Steinberg, Betreuer dieser Arbeit).

## 2.5.1 HuminFeed®- Konzentrationen

Während der Versuche wurde stets mit einer Stammlösung von HuminFeed<sup>®</sup> mit einer Konzentration von 1g/I HF (entspricht 35 mmol/I DOC) gearbeitet. Zur Herstellung dieser Stammlösung wurde 0.5 g HuminFeed<sup>®</sup> in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Um den Lösungsvorgang zu unterstützen, wurde der mit HuminFeed<sup>®</sup> und destilliertem Wasser gefüllte Kolben auf einen Magnetrührer (VEB Labortechnik Ilmenau, Deutschland) für ca. 30 min gestellt. Dann wurde die HuminFeed<sup>®</sup>-Stammlösung im Kühlschrank (dunkel, 6 °C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Weitere Informationen über die allgemeinen Eigenschaften und die Angabe der Bestandteile von HuminFeed<sup>®</sup> siehe unter: <a href="http://www.humintech.com/001/animalfeeds/products/huminfeed.html">http://www.humintech.com/001/animalfeeds/products/huminfeed.html</a>

Um die Auswirkungen des Huminstoffpräparates HuminFeed<sup>®</sup> (in Abhängigkeit von der Futterqualität) auf *D. magna* zu untersuchen, wurde HuminFeed<sup>®</sup> in drei unterschiedlichen Konzentrationen dem Daphnienmedium mit verschiedenen Nahrungsquellen zugesetzt (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Getestete HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen (entsprechende Konzentrationen des gelösten organischen Kohlenstoffes DOC ist hier auch angegeben)

Ansatz	HuminFeed <sup>®</sup> -Konzentrationen	DOC (mmol/l)
	(mg/l)	
Kontrolle	0	0
Niedrige HF-Konzentration	1	0.04
Hohe HF-Konzentration	25	0.90

Zur Herstellung der Testlösungen mit den festgelegten Konzentrationen wurde das entsprechende Volumen der HuminFeed<sup>®</sup>-Stammlösung dem 1L-Daphnienmedium zugeführt. Das bedeutet, dass 1 ml HuminFeed<sup>®</sup>-Stammlösung für die niedrige HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration oder 25 ml HuminFeed<sup>®</sup>-Stammlösung für die hohe HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration benutzt wurde.

## 2.6 Futterqualitäten

#### 2.6.1 Coccale Mikrogrünalge Pseudokirchneriella subcapitata

Pseudokirchneriella subcapitata (Koršikov) Hindák (syn. Selenastrum capricornutum, Ankistrodesmus subcapitata, Raphidocelis subcapitata) ist eine Mikrogrünalge (zur Systematik dieser Alge siehe Tabelle 5), die als Einzelzelle vorkommt. Sie hat eine mondsichelförmige Gestalt (siehe Abbildung 5) vermehrt sich vegetativ über Zellteilung mit 2, 4 oder 8 Autosporen und ist obligatorisch autotroph (Nygaard et al. 1986).

**Tabelle 5:** Taxonomie der Alge *P. subcapitata* (Koršikov) Hindák (vorher als Raphidocelis subcapitata genannt)<sup>5</sup>.

#### 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.

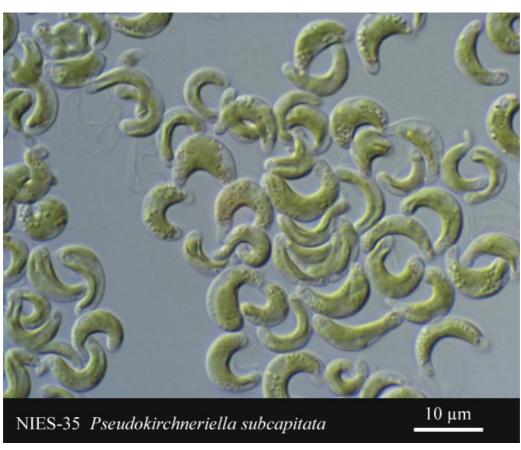


Abbildung 5: Mikrogrünalge P. subcapitata<sup>6</sup>

<sup>5</sup> Klassifikation der Alge *P. subcapitata* bei: Systema Naturae 2000 unter: <a href="http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=559931&tree=0.1">http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=559931&tree=0.1</a>

\_

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Quelle: <u>http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetail.jsp</u>

#### Auswahl der Alge

Für Daphnien als unselektive Filtrierer ist deshalb 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 wenig geeignetes Futter für Zooplankter (Lampert 1987, Gulati und DeMott 1997). Geller und Müller haben 1981 nachgewiesen, dass *Daphnia magna* sich von Partikeln im Bereich von 0.6- 40 μm ernährt.

Als Futteralge wurde die Mikrogrünalge *P. subcapitata* aus verschiedenen Gründen gewählt. Sie ist reich an Proteinen, Phosphor (Muñoz-Mejía and Martínez-Jerónimo, 2007) und Fettsäuren (Patil et al. 2007). Sie gilt als Nahrungsquelle von hoher Qualität und wurde bereits in vielen Experimenten als Zooplanktonfutter verwendet (z. B. Zarattini & Mura 2004, Muñoz-Mejía & Martínez-Jerónimo 2007, Olmstead & LeBlanc 2007). Außerdem ist sie reich an Vitamin C (als Pflanze) und hat einen mittleren Durchmesser von 3.85 μm (gemessen mit dem Zellanalysesystem CASY1, Schärfe, Reutlingen, Deutschland), so dass diese Mikrogrünalge ein qualitativ hochwertiges Futter darstellt und sehr gut von *D. magna* aufgenommen werden müsste.

Die in dieser Arbeit verwendete Stammkultur der Alge gehört zu der Algenstammsammlung des Instituts für Biologie, Arbeitgruppe Gewässerökologie, der Humboldt-Universität zu Berlin. Ursprünglich wurde die coccale Mikrogrünalge *P. subcapitata* 1959 von O. Skulberg in Norwegen aus dem Fluss Nitelva bei Akershus isoliert (Sammlung von Algenkultur Göttingen SAG). Routinemäßig wurden die Algen im Frischwasser-Medium FW04-Medium (Nicklisch et al. 2008) kultiviert (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Algenmediums (Nicklisch et al. 2008); Endkonzentration: 2  $\mu$ mol/l Fe, 4  $\mu$ mol/l EDTA, 2.16 mmol/l HCO3, N:P = 20 und die Spurenelemente sind alle in Endkonzentration angegeben.

Substanz	Konzentration in der Nährmedium
Makroelemente	mmol/l
CaCO <sub>3</sub>	0.90
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0.50
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.25
KCI	0.10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.01
HCI	0.20
Spurenelemente	μmol/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4.00
Mn SO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0.80
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.04
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.04
AIK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 12 H <sub>2</sub> O	0.08
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.04
NiSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.04
KBr	0.08
KJ	0.04
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.06
Eisen-EDTA-Lösung	mmol/l
Na2-EDTA	2.00
Fe-EDTA	1.00

Die Algen wurden in einer *batch*-Kultur (diskontinuierliche Kultur, Abbildung 6) nach Kohl und Nicklisch (1988) unter Standardlaborbedingungen im Daphnienzuchtraum kultiviert (Details siehe Anhang).



Abbildung 6: Algenzuchtanlage

Da der Einfluss der Futterquantität auf *D. magna* untersucht werden sollte, wurde darauf geachtet, dass die verwendete Alge von gleichbleibender Qualität waren. Um möglichst gleichmäßig stabile Qualität der Mikrogrünalge *P. subcapitata* zu halten, wurden die Algen während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die durch Ernten gewonnene Algensuspension wurde im Kühlschrank (dunkel, 6 °C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Da in dieser Arbeit ermittelt werden sollte, wie sich unterschiedliche Futterqualitäten auf die Lebensparameter von *D. magna* auswirken, wurde darauf geachtet, dass die Algenfutterkonzentration während des gesamten Zeitraumes dieser Arbeit möglichst identisch blieb (ca. 8 mm³/l Biovolumen; entspricht ca. 8 mg/l Biomasse).

Für die Bestimmung des Biovolumens der Mikrogrünalge *P. subcapitata* standen ein Photometer (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg, Deutschland), sowie ein Zellanalysesystem (CASY1, Schärfe, Reutlingen,

Deutschland) zur Verfügung. Am Photometer wurde die Extinktion der Algenproben bei 546 nm gemessen. Mit Hilfe des Zellanalysesystems konnten die photometrisch gewonnenen Daten kalibriert werden. Dieses ist in der Lage, Anzahl und mittleres Volumen der einzelnen Zellen der Alge zu bestimmen und daraus das Biovolumen abzuleiten. (Details der Algenbiovolumenbestimmung siehe Anhang).

## 2.6.2 Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen 1883)

Saccharomyces cerevisiae, die sogenannte Bäckerhefe, gehört zu den Pilzen (zur Systematik siehe Tabelle7).

**Tabelle 7:** Systematik der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*<sup>7</sup>

```
Biota

Domain Eukaryota - eukaryotes

Kingdom Fungi T.L. Jahn & F.F. Jahn, 1949 ex R.T. Moore, 1980 - fungi

Subkingdom Dikarya D.S. Hibbett et al., in D.S. Hibbett et al., 2007

Phylum Ascomycota H.C. Bold, 1957 ex T. Cavalier-Smith, 1998 - sac fungi

Subphylum Saccharomycotina O.E. Eriksson & K. Winka, 1997 - budding yeasts

Class Saccharomycetes G. Winter, 1881

Order Saccharomycetales™ Kudrjanzev, 1960

Family Saccharomycetaceae™ G. Winter, 1881

Genus Saccharomyces™ Meyen ex E.C. Hansen, 1838
```

Zellen von *S. cerevisiae* sind rund bis oval (Abbildung 7) und haben einen Durchmesser von 5–10 μm. Sie vermehren sich durch den Prozess der Knospung<sup>8</sup>. *S. cerevisiae* wurde bereits in vielen Studien als

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C. Hansen, 1883

<sup>8</sup> Weitere Informationen siehe unter: http://de.wikipedia.org/wiki/Backhefe

\_

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Klassifikation bei: Systema Naturae 2000 unter: http://www.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=2625&tree=0.1

Zooplanktonfutter verwendet (z. B. Michels & De Meester 1998; Zarattini & Mura 2004; Peña-Aguado et al. 2005).

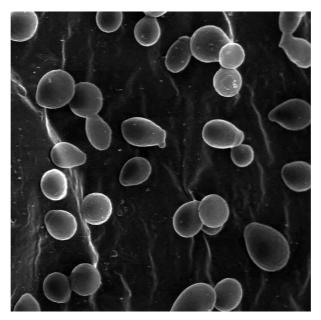


Abbildung 7: Saccharomyces cerevisiae<sup>9</sup>

Die in dieser Arbeit verwendete Hefe war im Supermarkt unter dem Namen UNIFERM Frisch-Backhefe erhältlich (UNIFERM GmbH & Co. KG., Werne, Deutschland) und wurde in einer Konzentration von 0.05 g/l in Daphnienmedium ADaM gelöst. Für eine gleichmäßig Verteilung wurde die zugegebene Bäckerhefe mit Hilfe eines Magnetrührer (VEB Labortechnik Ilmenau, Deutschland) im Daphnienmedium ADaM gelöst.

# 2.6.3 Frische Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* plus Ascorbinsäure (Vitamin C)

Die frische Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae ist schon oben kurz beschrieben.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>Quelle: http://www.mskreport.com/articles.cfm?articleID=2911.

#### **Ascorbinsäure (Vitamin C)**

Ascorbinsäure ist eine bedeutende Verbindung für Pflanzen und Tiere. Sie hat eine Reihe von physiologischen Funktionen. Als Radikalfänger hat Ascorbinsäure, auch Vitamin C genannt, eine antioxidative Wirkung durch Beseitigung der reaktiven Sauerstoff-Spezies ROS (reactive oxygen species) (Apel und Hirt 2004). Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure bilden ein wichtiges Redoxsystem.

Abbildung 8: Strukturformel der Ascorbinsäure. Quelle: www.wikipedia.de

Das hier verwendete Vitamin C wurde bei Sigma-Aldrich, Deutschland produziert und wurde in einer Konzentration von 2 mg/l in Daphnienmedium gelöst. Zusätzlich zum Bäckerhefefutter wurde parallel Vitamin C zugesetzt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die Versuchstiere eine antioxidative Reaktion aufgrund der Aufnahme des Radikalfängers Ascorbinsäure aufweisen können und die erwarteten negativen Auswirkungen des Huminstoffes auf die Versuchstiere verringert werden. Berücksichtigt wurden nur die Lebensdauer und die Fruchtbarkeit der Versuchstiere. Der biochemische Aspekt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

### 2.7 Experimentelles Design

Für jeden Ansatz dieser Arbeit wurden 50 gleich alte Versuchstiere benötigt. Aus diesem Grund ging den eigentlichen Experimenten die Zucht auf Biomasse voraus. Vor den eigentlichen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden neun Vorkulturen zu allen verwendeten HuminFeed<sup>®</sup>-

Konzentrationen und Futterqualitäten angesetzt. Als genügend Weibchen vorhanden waren, die sich alle zur selben Zeit im gleichen Alter befanden, wurde mit den eigentlichen Versuchen dieser Arbeit begonnen. Erst nach mindestens 5 Generationen wurden die Weibchen der Art D. magna als Versuchstiere verwendet. Bei jeder Futterqualität wurden parallel drei Ansätze mit unterschiedlichen HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen getestet. 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 angelegt. Drei Futterqualitäten und drei HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen wurden überprüft. Das experimentelle Design bestand also aus:

3 unterschiedlichen Futterqualitäten x 3 verschiedenen HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen x 5 je Versuchstiere x jeweils 10 Replikate = 450 Versuchstiere in neunzig 100 Milliliter-Kolben für neun verschiedene Ansätze (Tabelle 8) .

**Tabelle 8:** Experimentelles Design. K= Kontrolle (Futter ohne HuminFeed<sup>®</sup> HF), PS= Mikrogrünalge *P. subcapitata*, HF1= Niedrige HF-Konzentration, HF2= hohe HF-Konzentration<sup>10</sup>, V.C= Vitamin C

Futteralgen (ca. 8 mg/l)	Bäckerhefe (0.05 g/l)	Bäckerhefe + V.C (2 mg/l)
К	K	K
PS+ HF1	Hefe + HF1	Hefe + V.C+ HF1
PS+ HF2	Hefe + HF2	Hefe + V.C+ HF2

## 2.8 Datenerhebung

Bei den 9 verschiedenen Ansätzen wurden Daten zur Bestimmung der Überlebensrate und der Reproduktionsrate der Versuchstiere aufgenommen.

-

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Siehe Tabelle 4

Die Versuchstiere wurden täglich, einschließlich dem Wochenende, kontrolliert, um die 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 Nachkommen gezählt und dann entfernt wurden. Die ermittelte Nachkommenzahl eines Versuchskolbens wurde durch die Zahl der überlebenden Versuchstiere (Mütter) an diesem Tag geteilt (Reproduktionstest). Beim Umsetzten wurden die Versuchstiere in eine weiße Photoschale überführt, mit einer zurechtgeschnitten durchsichtigen Plastikpipette vorsichtig aufgesaugt und dann in einen mit destilliertem Wasser gesäuberten Kolben wieder eingesetzt. Im Kolben befand sich frisches ADaM, welches mit entsprechendem Futter und entsprechender HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration versetzt war. Die Photoschale und die Plastikpipette wurden vor und nach jeder Benutzung mit destilliertem Wasser gereinigt.

Die Reproduktionsleistung von Versuchstieren wird auf die folgende Weise angegeben: Anzahl der Nachkommen, die pro Weibchen und Tag ab dem ersten Tag, an dem Nachkommen festgestellt wurden, produziert werden. Zusätzlich wird die Gesamtnachkommenzahl pro Weibchen protokolliert. Die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut wurde ebenfalls notiert. Die Reproduktionsleistung der Versuchstiere, die der Prüfsubstanz (HuminFeed<sup>®</sup>) ausgesetzt wurden, wurde mit der Leistung der Kontrolle verglichen.

#### 2.9 Statistische Datenauswertung

Um die Effekte des in verschiedenen Konzentrationen applizierten HuminFeeds<sup>®</sup> auf die Lebensparameter von *Daphnia magna* untersuchen zu können, müssen die zur Auswertung herangezogenen statistischen Methoden folgende Ansprüche erfüllen: Zum einen muss die Abweichung der belasteten Ansätze von den unbelasteten Kontrollen berücksichtigt werden, zum anderen der zeitliche Verlauf innerhalb der einzelnen Ansätze. Außerdem ist der Tod aller Versuchstiere pro Ansatz als Endpunkt zu vergleichen und zu berücksichtigen.

Die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Daten des Reproduktionstests und des Überlebenstests wurden auf eigenen Datenblättern (Tabellen) protokolliert dann mit Excel (Microsoft Office 2000) erfasst und als Diagramme dargestellt. Die Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen wurden auch mit Microsoft Excel vorgenommen.

Für den Überlebenstest (Lebensdauertest) eines jeden Ansatzes 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<sup>11</sup>.

Für den Reproduktionstest wurde die Anzahl der Nachkommen in jedem Ansatz protokolliert, die Durchschnittswerte der Nachkommenzahl pro Weibchen und Tag berechnet und anschließend der Mittelwert der Nachkommen pro Weibchen (Versuchstier) und Tag für jeden Ansatz über

34

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Log Rank Test steht unter: <a href="http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/">http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/</a> zur Verfügung

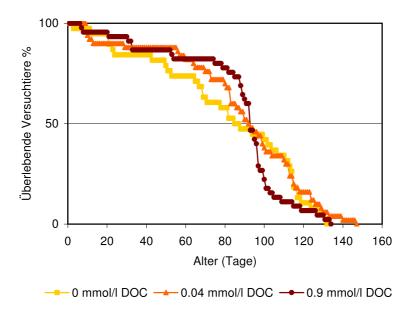
den gesamten Versuchszeitraum ermittelt. Gezählt wurde ab dem Tag der ersten Brutanlage. Die Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (One Way Analyse of Variance) unter Zuhilfenahme Software SigmaStat 3.5 (SigmaStat 3.5, SPSS Inc., USA) bestimmt.

## 3 Ergebnisse

# 3.1 Ergebnisse zum Verhalten von *D. magna* bei Fütterung mit der Mikrogrünalge *Pseudokirchneriella subcapitata*

# 3.1.1 Lebensdauer von *D. magna* bei Fütterung mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata*

Abbildung 9 zeigt die Überlebensrate von den Versuchstieren der Art *D. magna* (Prozentsatz der überlebende Versuchstiere pro Tag) bei Fütterung mit Mikrogrünalge *P. subcapitata.* Im Durchschnitt wiesen die Versuchstiere der Kontrollgruppe eine geringere Lebensspanne (82 Tage) auf als die Versuchstiere mit HuminFeed<sup>®</sup>-Exposition (siehe Tabelle 9).



**Abbildung 9:** Überlebensrate von *D. magna* auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>.

Beim Kontrollansatz wurde der Median am 86. Versuchstag erreicht, während bei den beiden Ansätzen mit HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz am 92. Versuchstag noch 50 % der Versuchstiere lebten. In Abbildung 9 ist aber gut zu erkennen, dass die Zahl der überlebenden Versuchstiere im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC ab einem Alter von 90 Tagen (im zweiten Lebensteil) stark

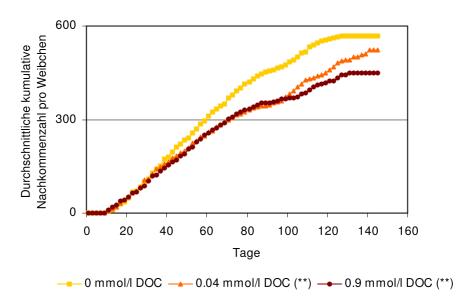
gesunken ist. Das letzte Versuchstier in der Kontrollgruppe ist am 131. Versuchstag gestorben. In dem Ansatz mit einer HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration von 0,9 mmol/l DOC ist das letzte Versuchstier am Versuchstag 133 gestorben. Die längste Lebensdauer mit 146 Tagen wurde bei einem Versuchstier im Ansatz mit der niedrigen HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration (0,04 mmol/l DOC) festgestellt.

Obwohl die prozentuale durchschnittliche Lebensdauer (Mittelwert), der prozentuale Median und die prozentuale maximale Lebensdauer der Versuchstiere auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* mit Zusatz von HuminFeed<sup>®</sup> (0.04 oder 0.9 mmol/l DOC) erhöht waren, sind die Ergebnisse im Verhältnis zur Kontrollgruppe nicht signifikant (siehe Tabelle 9). Das bedeutet, dass HuminFeed<sup>®</sup> die Lebensspanne von *D. magna* auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* nicht moduliert hat.

# 3.1.2 Reproduktion von *D. magna* bei Fütterung mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata*

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von HuminFeed<sup>®</sup> auf die Reproduktion von *D. magna.* 

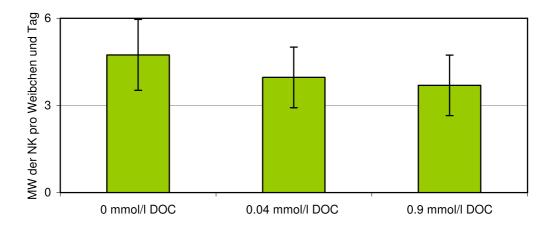
Die Zeit bis zur Anlage des ersten Geleges betrug 11 Lebenstage bei allen Versuchstiere auf Mikrogrünalge P. subcapitata. Abbildung 10 zeigt die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen bei den HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen Ρ. verschiedenen auf Mikrogrünalge subcapitata. Die höchste Gesamtnachkommenzahl wurde mit durchschnittlich 568.84 Nachkommen pro Weibchen bei der Kontrolle nachgewiesen. Sie somit über der durchschnittlichen lag Gesamtnachkommenzahl im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC mit 118.49 Nachkommen darstellt (siehe Tabelle 10) . Die Gesamtnachkommenzahl des Ansatzes mit 0,04 mmol/l DOC lag bei 523.35 Nachkommen pro Weibchen unter der Kontrolle.



**Abbildung 10:** Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Die Unterschiede zu der Kontrolle sind auf dem p<0.001(\*\*) Niveau signifikant.

Die Unterschiede zur Kontrolle wurden bei beiden mit HuminFeed<sup>®</sup> Ansätzen als signifikant bei p<0.001 (\*\*) erkannt. Demnach verursacht HuminFeed<sup>®</sup> eine signifikante Verringerung der Reproduktion (Fruchtbarkeit) von *D. magna* auf Mikrogrünalge *P. subcapitata*.

In Abbildung 11 ist gut zu sehen, dass die beiden Gruppen mit HuminFeed<sup>®</sup> eine geringere Anzahl an Nachkommen pro Weibchen und Tag aufwiesen als die Kontrollgruppe.



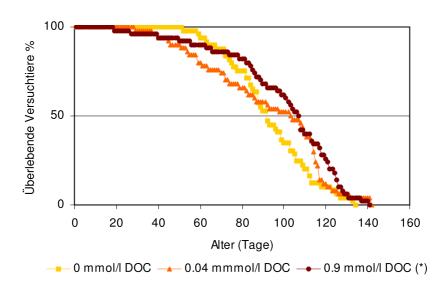
**Abbildung 11**: Reproduktionsrate von *D. magna* auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Fehlerindikator ist als ±SEM (Standard Error of The Mean) angegeben. MW= Mittelwert, NK= Nachkommen.

Der Abstand zwischen zwei Bruten lag bei 3-4 Tagen. Die Gelegegröße war am Versuchstag 47 mit 41 Nachkommen von einem Weibchen der Kontrollgruppe sehr groß. Auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* haben die Versuchstiere keine Ephippien produziert.

# 3.2 Ergebnisse zum Verhalten von *D. magna* bei Fütterung mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

## 3.2.1 Lebensdauer von *D. magna* bei Fütterung mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae*

Abbildung 12 zeigt die überlebenden Versuchstiere (%) während der Versuchstage dieser Arbeit auf Bäckerhefe. Die Untersuchungen haben ergeben, dass im Überlebenstest der Art *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* signifikante lebensverlängernde Effekte mit p<0.05 im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC im Verhältnis zur Kontrollgruppe erzielt wurde. Im Ansatz mit 0.04 mmol/l DOC erreichten die Unterschiede zur Kontrolle keinen signifikanten Wert (p= 0.239). Im Durchschnitt zeigten die Versuchstiere des Ansatzes mit 0.04 mmol/l DOC die geringste Lebensdauer mit 92.66 Tagen. Im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC waren die Tiere im Durchschnitt mit 99.98 Tagen am ältesten. Die Kontrolltiere lagen mit einem Mittelwert von 93.29 Tagen mit ihrer Lebensdauer zwischen den beiden anderen Ansätzen.



**Abbildung 12:** Überlebensrate von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Der Unterschied zu der Kontrolle ist auf dem p<0.05 (\*) Niveau signifikant.

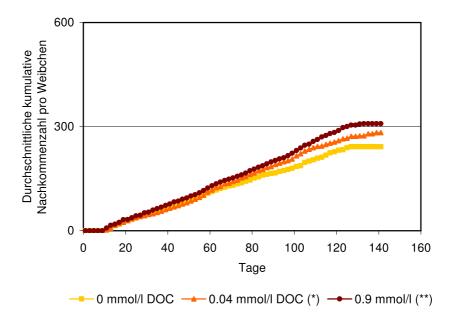
Der höchste Median der Lebensspanne von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* konnte mit 107 Tagen im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC festgestellt wurden. Am 103. Versuchstag waren noch 50% der Versuchstiere im Ansatz mit 0.04 mmol/l DOC am Leben. Im Kontrollansatz könnten 50% der Versuchstiere nur 91.50 Tage überleben. Die Kontrollgruppe wies die kleinste maximale Lebensdauer mit 133 Tagen auf. Die größte maximale Lebensdauer wurde im Ansatz mit 0.04 mmol/l DOC gemessen (141 Tage). Der Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC zeigte eine maximale Lebensdauer von 140 Tagen (Tabelle 9).

## 3.2.2 Reproduktion von *D. magna* bei Fütterung mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae*

An ihrem 11. Lebenstag haben die Versuchstiere aller Ansätze auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* mit unterschiedlichen HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen ihre erste Brut angelegten.

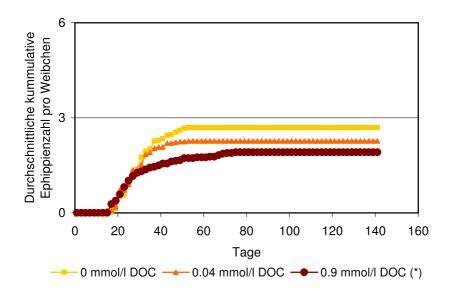
Die Fruchtbarkeit der Versuchstiere in der Ansätze auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* in Anwesenheit von HuminFeed<sup>®</sup> unterschied sich signifikant zur Kontrolle (p<0.05 beim Ansatz mit 0.04 mmol/l DOC und p<0.001 beim Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC). In Tabelle 10 wurde die durchschnittliche

kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen aller Ansätze auf Bäckerhefe aufgelistet. Die grafische Darstellung ist in Abbildung 13 gezeigt. Die geringste durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl wurde im Kontrollansatz produziert (242.15 Neonaten pro Weibchen). Der Verlauf der Summenkurve dieses Ansatzes ist am flachsten. Während beim Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC betrug die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl sogar 308.58 Neonaten pro Weibchen.



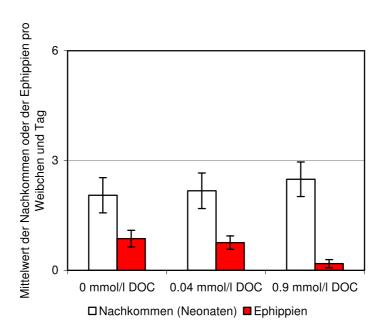
**Abbildung 13:** Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Der Unterschied zu der Kontrolle ist auf dem p<0.05 (\*) und 0.001 (\*\*) Niveau signifikant.

Als die Versuchstiere auf Bäckerhefe (mit oder ohne HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz) 17 Tage alt waren (Oktober-Mitte), traten Ephippien ohne Männchen auf. Dieses Phänomen dauerte ca. 6 Wochen (Abbildung 14). Die durchschnittliche kumulative Ephippienzahl ist mit HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz in Konzentration von 0.9 mmol/l DOC signifikant geringer als die durchschnittliche kumulative Ephippienzahl in der Kontrolle (p<0.05). Beim Ansatz mit 0.04 mmol/l DOC war die Zahl der Ephippien ebenfalls geringer, zeigte aber keinen signifikanten Wert (p=0.430).



**Abbildung 14:** Durchschnittliche kumulative Ephippienzahl von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Der Unterschied zu der Kontrolle ist auf dem p<0.05 (\*) Niveau signifikant.

Abbildung 15 stellt einen Vergleich zwischen der durchschnittlichen Ephippienzahl und der Neonatenzahl (Nachkommenzahl) pro Weibchen und Tag im Zeitraum der Ephippien-Produktion dar. Es ist deutlich zu sehen, dass die durchschnittliche Ephippienzahl pro Weibchen und Tag geringer als die durchschnittliche Nachkommenzahl war (0.87 in der Kontrolle, 0.76 mit 0.04 mmol/l DOC und 0.73 mit 0.9 mmol/l DOC). Außerdem haben nur wenige Mütter Ephippien produziert.



**Abbildung 15**: Reproduktionsrate von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Fehlerindikator ist als ±SEM angegeben.

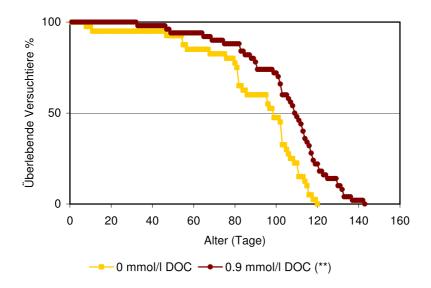
Der höchste Mittelwert der Nachkommen pro Weibchen und Tag bei Fütterung mit Bäckerhefe während des gesamten Zeitraumes dieser Arbeit war in den Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC und betrug ca. 2.49. Während dieser Mittelwert betrug nur 2.05 in der Kontrollgruppe (Abbildung 15).

# 3.3 Ergebnisse zum Verhalten von *D. magna* bei Fütterung mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* plus Vitamin C

# 3.3.1 Lebensdauer von *D. magna* bei Fütterung mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C

Im Ansatz auf Bäckerhefe und Vitamin C plus 0.04 mmol/l DOC starben 50% der Versuchstiere nach 27 Tagen des Versuchanfangs. Deshalb wurden die Ergebnisse dieses Ansatzes nicht dargestellt, obwohl die Daten des Reproduktionstests und Überlebenstests bis zum Tod des letzten Versuchstiers dieses Ansatzes gesammelt wurden.

Die Überlebenschance der Daphnien stieg auf Bäckerhefe plus Vitamin C mit dem Zusatz von HuminFeed<sup>®</sup> (0.9 mmol/l DOC). Die Versuchstiere im Ansatz, dem HuminFeed<sup>®</sup> in einer Konzentration von 0.9 mmol/l DOC zugegeben wurde, zeigten sowohl im Durchschnitt, im Median als auch in der maximalen Lebensdauer eine signifikante Erhöhung zur Kontrollgruppe (p<0.001\*\*) (Abbildung 16).



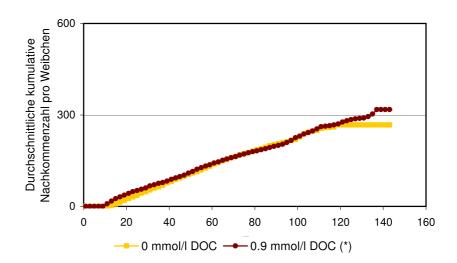
**Abbildung 16:** Überlebensrate von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Der Unterschied zu der Kontrolle ist auf dem p<0.05 (\*) und p<0.001 (\*\*) Niveau signifikant.

Vergleicht man die durchschnittliche Lebensspanne, so wurde deutlich, dass diese im Ansatz mit 0.9 mmol/l gegenüber der Kontrolle um ca. 6 Tagen verlängert war. Bei Betrachtung der Medianwerte war der Unterschied noch deutlicher. Denn nach 109 Tagen war die Hälfte der Versuchstiere im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC gestorben, während bei der Kontrollgruppe 50% der Versuchstiere nur 98.50 Tage überleben. Die maximale Lebensspanne zeigte beim Ansatz mit 0.9 mmol/l eine Verlängerung um sogar 23 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 9).

# 3.3.2 Reproduktion von *D. magna* bei Fütterung mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C

Während die Vesuchtiere bei der hohen HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration (0.09 mmol/I DOC) am 11. Lebenstag alle ihre ersten Gelege im Mittelwert mit 8.38 Nachkommen anlegten, war die Reproduktion bei den beiden anderen Ansätzen (Kontrolle und mit niedriger HuminFeed<sup>®</sup> -Konzentration) stark herabgesetzt, da nur vereinzelte Gelege mit einem Ei zu finden waren.

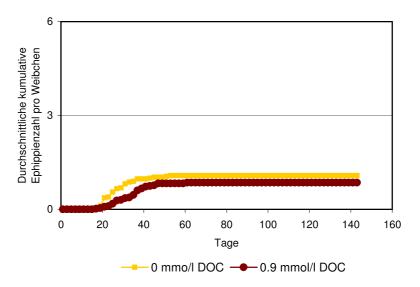
Die Abbildung 17 zeigt die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl beider Ansätze mit und ohne HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C. Gut zu erkennen ist, dass die Versuchstiere auf hoher HuminFeed<sup>®</sup> -Konzentration (0.09 mmol/l DOC) mehr Nachkommen als die Versuchstiere auf Kontrolle (ohne HuminFeed<sup>®</sup>) produziert. Signifikante Unterschiede sind ermittelt worden ( p<0.05). Die Gesamtnachkommenzahl des Ansatzes mit 0,9 mmol/l DOC zeigte eine Erhöhung um ca.1/5 im Verhältnis zur Kontrolle (Tabelle 10).



**Abbildung 17:** Durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Der Unterschied zu der Kontrolle ist auf dem p<0.05 (\*) Niveau signifikant.

Die Überlebens- und Reproduktionsdaten der Versuchstiere auf Bäckerhefe plus Vitamin C und niedriger HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration (0.04 mmol/l DOC) wurden regelmäßig gesammelt, aber nicht berücksichtigt und in Abbildungen (16 und 17) dargestellt, da die Versuchstiere in dem genannten Ansatz krank und durchsichtig waren und zum Teil starke Deformationen aufwiesen. Die Eier, die von diesen Versuchstieren produziert wurden, gelangten ins Wasser und konnten deshalb nicht zur Reife gelangen.

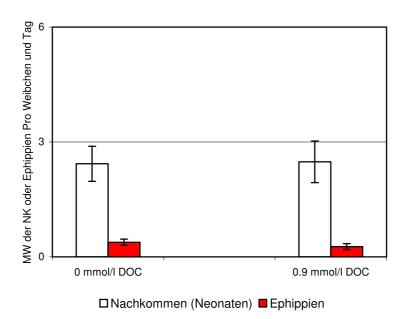
In einem Zeitraum von ca. 40 Tagen in der Kontrollgruppe und von 60 Tagen im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC produzierten die mehr als zwei Wochen alten Versuchstiere Ephippien. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Kontrollansatz und dem Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC (p=0.050). Es ist aber in Abbildung 18 und 19 deutlich, dass die Versuchstiere im Ansatz mit HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz weniger Ephippien als die Versuchstiere im Kontrollansatz produzierten.



**Abbildung 18:** Durchschnittliche kumulative Ephippienzahl von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>.

Abbildung 19 zeigt einen Vergleich zwischen der durchschnittlichen Ephippienzahl und der durchschnittlichen Neonatenzahl pro Weibchen und Tag im Zeitraum der Ephippien-Produktion. Es ist deutlich zu sehen, dass durchschnittliche Ephippienzahl pro Weibchen und Tag zu gering war (0.39

in der Kontrolle und 0.27 mit 0.9 mmol/l DOC). Außerdem produzierten nur wenige Weibchen Ephippien.



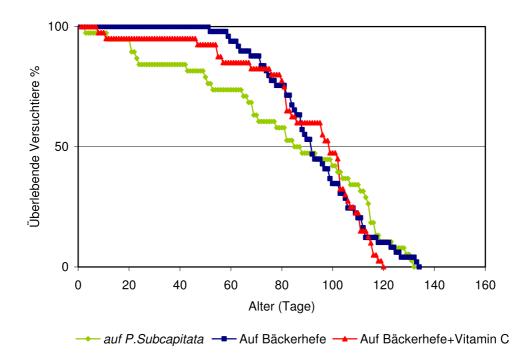
**Abbildung 19**: Reproduktionsrate von *D. magna* auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* plus Vitamin C in Abhängigkeit von HuminFeed<sup>®</sup>. Fehlerindikator ist als ±SEM angegeben.

## 3.4 Zusätzlicher Vergleich

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich die Überlebensrate und die Reproduktionsrate aller Ansätze im Bezug auf die verschiedenen Futterqualitäten und HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen verglichen werden.

Das Überleben der Versuchstiere bei verschiedenen Futterqualitäten der Kontrollgruppen unterschied sich kaum. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (p= 0.93 beim Vergleich zwischen den Kontrollgruppen auf *P. subcapitata* und auf Bäckerhefe, und p=0.37 beim Vergleich zwischen den Kontrollgruppen auf *P. subcapitata* und auf Bäckerhefe plus Vitamin C). Abbildung 20 zeigt die grafische Darstellung der Daten der Lebensdauer von *D. magna* in Abhängigkeit von Futterqualität. Deutlich zu erkennen, dass 100% der Versuchstiere auf Bäckerhefe 51 Tage überlebten, während zu diesem Zeitpunkt nur noch ca. 77% der

Versuchstiere auf *P. subcapitata* und 93% der Versuchstiere auf Bäckerhefe plus Vitamin C lebten.



**Abbildung 20:** Vergleich der Überlebensrate von *D. magna* in Abhängigkeit von Futterqualität (Kontrollgruppen ohne HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz)

Betrachtet man noch den Median, den Mittelwert und die maximale Lebensdauer, weisen die Versuchstiere auf Bäckerhefe und auf Bäckerhefe plus Vitamin C im Vergleich mit den Versuchstieren auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* eine erhöhte Lebensdauer auf (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Statistische Analyse des Überlebenstests von *D. magna* in Abhängigkeit von Futterqualitäten und HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen. Statistische Signifikanz: (\* p<0.05; \*\* p<0.001) ist auch angegeben.

Ansatz	Median		Mittelwert		Maximal		р
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	
P. subcapitata	86	100	82	100	131	100	
Kontrolle							
P. subcapitata	92	106.98	88.10	107.44	146	111.45	0.483
+0.04 mmol/l							
DOC							
P. subcapitata	92.75	107.85	85.96	104.82	133	101.53	0.589
+0.9 mmol/l							
DOC							
S. cerevisiae	91.50	100	93.29	100	133	100	
Kontrolle							
S. cerevisiae	103	112.57	92.66	99.33	141	106.02	0.239
+0.04 mmol/l							
DOC							
S. cerevisiae	107	116.94	99.98	107.18	140	105.26	<0.05
+0.9 mmol/l							
DOC							
S. cerevisiae	98.50	100	89.98	100	119	100	
+Vitamin C							
Kontrolle							
S. cerevisiae	109	110.66	104.72	116.39	142	119.33	<0.001
+Vitamin C							
+0.9 mmol/l							
DOC							

Die Dauer eines Reproduktionszyklus war sicherlich nicht von den Nahrungsbedingungen abhängig, denn die Versuchstiere aller Ansätze der vorliegenden Untersuchungen begannen am Tag 11 mit der Reproduktion und der zeitliche Abstand zwischen den Gelegen war stets gleich. Allerdings wurde deutlich, dass sowohl die Versuchstiere als auch ihre Nachkommen auf Algen größer als auf Hefe waren. Gelegengröße der Versuchstiere auf Algen war ebenfalls größer als auf Hefe (siehe Tabelle 10).

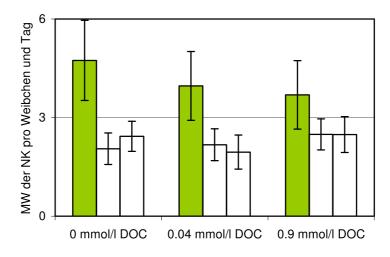
**Tabelle 10:** Ergebnisse des Reproduktionstests von *D. magna* in Abhängigkeit von Futterqualitäten und HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen. Signifikanz: (\* p<0.05; \*\* p<0.001) ist angegeben.

Ansatz	durchschnittliche	Irrtumswahrscheinlichkeit		
	kumulative	(p)		
	Nachkommenzahl pro			
	Weibchen			
P. subcapitata	568.84			
Kontrolle				
P. subcapitata	523.35	<0.001		
+0.04 mmol/l DOC				
P. subcapitata	450.26	<0.001		
+0.9 mmol/l DOC				
S. cerevisiae	242.15			
Kontrolle				
S. cerevisiae	282.66	<0.05		
+0.04 mmol/l DOC				
S. cerevisiae	308.58	<0.001		
+0.9 mmol/l DOC				
S. cerevisiae	267.40			
+Vitamin C				
Kontrolle				
S. cerevisiae	317.69	<0.05		
+Vitamin C				
+0.9 mmol/l DOC				

Da die Reproduktionsdaten von der ersten Brut bis zum Tod aller Weibchen gesammelt wurden, wurde bemerkt, dass sich die Fruchtbarkeit der Versuchstiere zwischen der Jungphase und der Pyramidephase unterscheidet.

Die in Abbildung 21 dargestellten Reproduktionsraten sind außer von den Futterqualitäten auch von den HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen abhängig. Es zeigte sich, dass sich die Futterqualität in den Experimenten mit Algen und

mit Bäckerhefe bzw. Bäckerhefe plus Vitamin C unterschiedlich auf die Versuchstiere auswirkten. Die reproduktiven Unterschiede waren signifikant (p<0.001). Vergleicht man die Kontrollgruppe auf Bäckerhefe mit Kontrollgruppe auf Bäckerhefe plus Vitamin C, findet man keinen signifikanten Unterschied (p= 0.248). Ebenfalls gab es keinen signifikanten Unterschied in den Ansätzen mit 0.9 mmol/l DOC (p= 0.208).



□ auf Mikrogrünalge □ auf Bäckerhefe (\*\*) □ auf Bäckerhefe +Vitamin C (\*\*)

**Abbildung 21:** Vergleich der Reproduktionsrate von *D. magna* in Abhängigkeit von Futterqualität und HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz. MW= Mittelwert, NK= Nachkommen. Die Unterschiede zu der Mikrogrünalge *P. subcapitata* sind auf dem p<0.001 (\*\*) Niveau signifikant.

Die Ephippien-Produktion wurde nur auf Bäckerhefe oder Bäckerhefe plus Vitamin C bemerkt. Bei HuminFeed®-Zusatz produzierte die Versuchstiere (in Abwesenheit von den Männchen) weniger Ephippien als die Versuchstiere auf der Kontrolle (Signifikanz wurde aber nur im Ansatz mit 0.9 mmol/l DOC Bäckerhefe (p<0.05)festgestellt). Versuchstiere, Mikrogrünalge Р. subcapitata den gefüttert wurden, haben in Versuchbedienungen dieser Studie keine Ephippien produziert.

### 4 Diskussion

Entsprechend der Bedeutung von *Daphnia magna* als Standardlabortier gibt es für diesen Organismus zahlreiche Studien zur Wirkung verschiedener Substanzen (z. B. Coors et al. 2004; Meems et al. 2004; Heckmann et al. 2007, 2008; Martins et al. 2007; Euent et al. 2008; Ren et al. 2009) und zum Einfluss der Futterqualität (z. B. Ahlgren 1990, Hessen 1990, Urabe et al. 1997, DeMott et al. 1998, Michels & De Meester 1998, Hansel et al. 2008).

Das Leben von *D. magna* stellt keinen einfachen und durch wenige Faktoren festgelegten Prozess dar. Erst eine Vielzahl miteinander, nicht bloß additiv wirkender, sondern sich gegenseitig beeinflussender biotischer (z. B. Futterqualität) und abiotischer Faktoren (z. B. chemische Substanzen wie Huminstoffe) erklärt ihre Lebensprozesse.

Die Futterqualität hängt von der mineralischen (Sterner 1990, 1993; Sterner et al. 1993) und der biochemischen Zusammensetzung (Ahlgren et al. 1990; Müller-Navarra 1995; Koch et al. 2009) der filtrierten Partikel ab. Ein Mangel an essentiellen Stoffen hat im Allgemeinen ein Krankheitsbild zur Folge. So ruft ein Mangel an Selen bei Daphnien Missbildungen und eine erhöhte Mortalität hervor( z. B. Winner 1984). Calcium-Mangel erhöht die Mortalität (Hessen et al. 2000). Und ein Mangel an Phosphor vermindert die Reproduktionsrate und reduziert das Wachstum (He & Wang 2008). Wesentliche biochemische Substanzen wie z. B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids PUFAs) können das Wachstum und die Reproduktion limnischer Zooplankter, und damit auch von *D. magna* limitieren (z. B. Müller-Navarra 1995).

Verschiedene chemische Substanzen haben deutliche Auswirkungen auf die Lebensparameter von *D. magna*. Huminstoffe zählen zu diesen (z. B. Euent et al. 2008).

Huminstoffe können in direkter und indirekter Weise auf Organismen wirken (Steinberg et al. 2006). Nach bisherigen Erkenntnissen können die direkten Wirkungen der Huminstoffe bei Organismen Stress auslösen. Mögliche Effekte sind unter anderem Störung der Membranfunktion, Veränderung der Enzymaktivität, Bildung von Stressproteinen z. B. heat-shock-proteins (HSP), oxidativer Stress sowie Reduktion der photosynthetischen Sauerstoffproduktion (Steinberg et al. 2008).

Diese Arbeit sollte Auskunft darüber geben, wie sich unterschiedliche Futterqualitäten plus chemischer Stress durch HuminFeed<sup>®</sup> auf die Lebensparameter von *D. magna* auswirken. Dazu wurden zwei Hauptaspekte: Reproduktion und Überleben der Versuchstiere betrachtet. Der biochemische Aspekt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

#### Vergleich der Kontrollgruppen der verschiedenen Futterqualitäten

Die Ergebnisse der Laborexperimente unterstützen die Hypothese, dass die Reproduktion von *D. magna* sowohl von den Nahrungsbedingungen als auch von chemischem Stress durch HuminFeed<sup>®</sup> beeinflusst wird. Die Fruchtbarkeit der Versuchstiere auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* war **signifikant höher** als derjenigen, die mit Bäckerhefe S. *cerevisiae* (mit oder ohne Vitamin C) gefüttert wurden (\*\* p<0.001).

Die durchschnittliche kumulative Nachkommenzahl pro Weibchen ist bei der Fütterung mit Mikrogrünalge *P. subcapitata* im Verhältnis zu den Versuchstieren bei Fütterung mit Bäckerhefe S. *cerevisiae* (mit oder ohne Vitamin C) um ca. **50% erhöht** (Tabelle 10).

Eine Erklärung hierzu könnte im **Nährstoffeinhalt** der Nahrung liegen. Es ist bekannt, dass die Abwesenheit wichtiger Lipide zu vermindertem Wachstum und verminderter Fruchtbarkeit von *D. magna* führt (Wacker & Martin-Creuzburg 2007).

Besonders: mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) und Sterole (auch Sterine genannt, aus der Obergruppe der Steroide) sind die in diesem Zusammenhang wichtigsten diskutierten Bestandteile der Nahrung.

Martin-Creuzburg und seine Kollegen (2008) haben nachgewiesen, dass die Abwesenheit der Sterole, aber nicht PUFAs die Futterqualität beschränken kann. Die Umstellung von der asexuellen zur sexuellen Reproduktion ist auch von der biochemischen Zusammensetzung der Nahrung abhängig (Koch et al. 2009). Bäckerhefe S. cerevisiae ist mangelhaft an vielen wesentlichen Fettsäure, die für eine optimale Reproduktionsleistung von Cladocera wichtig sind (Gulati & DeMott,1997). Daher wäre auf Grund der Nahrungsbestandteile zu erklären, warum die Reproduktion der Versuchstiere auf Algenfutter besser als bei denjenigen auf Hefefutter war.

Die praktischen Untersuchungen dieser Studie haben gezeigt, dass die Größe der Nachkommen und der Gelegen von den Versuchstieren (Müttern) abhängig sind. Die Versuchstiere und ihre Nachkommen auf Mikrogrünalgen *P. subcapitata* waren **größer** als die Versuchstiere und ihre Nachkommen auf Bäckerhefe S. *cerevisiae* (nicht gemessen, um den mechanischen Stress zu vermeiden). Neben den hier gefundenen Ergebnissen lassen sich auch in der Literatur Hinweise dafür finden, dass die maximal mögliche Gelegegröße adulter Daphnien in hohem Maße von deren Körpergröße abhängt (Gliwicz und Lampert 1994; Hülsmann 2001).

Glazier berichtete 1992, dass die Größe der Nachkommen positiv mit der Größe und dem Alter ihrer Mütter korreliert. Die Gelegengröße ist auch vom Alter der Mutter abhängig (Porter et al. 1983). Die maximale Gelegegröße wurde bei allen Ansätzen vorliegender Arbeit in den ersten Lebenswochen der Versuchstiere beobachtet. Dann hat die Gelegegröße mit dem Alter abgenommen, was den hohen Wert der Standardabweichung und SEM (Standard Error of The Mean) erklären sollte.

Überraschend war, dass die Versuchstiere auf Bäckerhefe S. cerevisiae tendenziell länger als die Versuchstiere auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* 

überlebten. Im Überlebenstest **stieg** der Median, der Mittelwert und die maximale Lebensdauer der Versuchstiere auf Bäckerhefe S. *cerevisiae* (mit oder ohne Vitamin C) im Verhältnis zu den Versuchstieren auf Mikrogrünalgen (in Kontrollgruppen). Allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Zu den Auswirkungen von Stress auf Organismen sind verschiedene Theorien aufgestellt worden. Die "Disposable Soma Theory" ist eine der wichtigsten Theorien (Kirkwood 1977; Kirkwood & Austad 2000). Von dieser Theorie versteht man, dass die vorhandenen Ressourcen eines Individuums, dem somatischen Wachstum, der Langlebigkeit oder der Reproduktion dienen und zwischen diesen verteilt werden. Die molekulare Grundlage dieser Theorie ist identisch mit der Green Theory of Ageing von Gems und McElwee (2003) zusammengefasst und grafisch dargestellt (Bouchnak & Steinberg in prep.). Da die Versuchstiere und ihre Nachkommen auf Mikrogrünalgen P. subcapitata größer als die Versuchstiere und ihre Nachkommen auf Bäckerhefe S. cerevisiae waren und das Leben der Versuchstiere auf Mikrogrünalgen P. subcapitata tendenziell kürzer als das Leben der Versuchstiere auf Bäckerhefe S. cerevisiae war, kann die Disposable Soma Theory hier bestätigt werden (Bouchnak & Steinberg in prep.). Außerdem traten keine Ephippien auf Mikrogrünalgen P. subcapitata im Gegensatz zum Hefefutter auf. Daher scheint Bäckerhefe S. cerevisiae als Stressfaktor zu wirken. Die Ergebnisse der biochemischen Analyse der parallel laufenden Diplomarbeit einer anderen Studentin (N. Ouerghemmi) hat gezeigt, dass Bäckerhefe S. cerevisiae als Futter oxidativen Stress induzierte, gemessen an einem signifikanten Anstieg Wasserstoffperoxidgehalts und der Konzentration des Antioxidanzien Ascorbinsäure, einhergehend mit einer Erniedrigung der TOSC total oxyradical scavenging capacity. Ebenso erhöhte sich der Gehalt an L- Prolin und kann als Signalgeber für oxidativen Stress angesehen werden.

Als weitere Erklärung, warum in der Lebensspanne von *D. magna* ein Verlängerungstrend bei den mit Bäckerhefe *S. cerevisiae* gefütterten Versuchstieren beobachtet wurde, wäre der **Lipid-Gehalt der Bäckerhefe**.

Lipide sind der dominante Energiespeicher der Zooplankter (60- 70% von ihrer Masse) und spielen eine wesentliche Rolle beim Überleben bei Futtermangel (Wetzel 2001). Verschiedene Studien (z. B. Veen & Lang 2004; Wachtler & Balsubramanian 2006) beschreiben die Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae als eine Quelle von Lipid-Verbindungen zum Beispiel Fettsäure, Sterole und Phospholipide. Daher könnte man davon ausgehen, dass Bäckerhefe eine **potenziale Rolle** für die Verlängerung des Lebens von *D. magna* spielen könnte.

#### Vergleich der Ansätze auf Mikrogrünalge P. subcapitata

Bei der Fütterung mit Mikrogrünalge *P. subcapitata* führte jede HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration zu signifikant verminderter Fruchtbarkeit (\*\* p<0.001). In Tabelle 10 ist die durchschnittliche Nachkommenzahl pro Weibchen bei den verschiedenen HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentrationen aufgelistet. Auf die Fruchtbarkeit der *D. magna*-Weibchen scheint der verwendete Huminstoff somit **negative Auswirkungen** zu haben.

Bestimmte funktionelle Gruppen der Huminstoffe ermöglichen Interaktion mit den Organismen auf subzellulärer, biochemischer und molekularbiologischer Ebenen (siehe Bouchnak & Steinberg in prep.). Folglich, haben die Huminstoffe das Potenzial, als natürliche chemische Stressoren zu wirken (Steinberg et al. 2003, 2006, 2008). Sie führen zur Sauerstoff-Aktivierung (ROS-Bildung) (Timofeyev et al. 2006a, 2006b; Steinberg et al. 2006, 2008; Meinelt et al. 2008) und induzieren Anti-Stress-Reaktionen, die Energie kosten und Embryotoxisch oder sogar tödlich sein kann (Steinberg 2003; Cazenave, et al. 2006; McMaster &Bond 2008). Diese Annahme entspricht auch den Ergebnissen von Cazenave et al. (2006). Cazenave und seine Kollegen haben 2006 nachgewiesen, dass die Embryonen des Zebrafisches unter Anwendung von Huminstoffen eine verzögerte Entwicklung und erhöhte Letalität aufwiesen. Auf Fruchtbarkeit des Wasserflohs D. magna hat der verwendete Huminstoff HuminFeed® somit einen toxischen Einfluss (Bouchnak & Steinberg in prep.).

In anderen Studien konnte auch eine hohe Reproduktionsrate der verschiedenen Wasserflöhe bei Fütterung mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata* ohne HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz erzielt werden (Euent et al. 2008, Rauch 2009). Rauch 2009 hat herausgefunden, dass Huminstoffe die Fruchtbarkeit beim Wasserfloh *Moina macrocopa* Straus modulieren. Dabei verursachen sie in geringen Konzentrationen milden Stress, der sich positiv auf die Darwinsche Fitness des Wasserflohs auswirkt und hormetische Effekte erzielt.

#### Vergleich der Ansätze auf Bäckerhefe S. cerevisiae

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sowohl die Reproduktion als auch das Überleben der Versuchstiere auf Bäckerhefe *S. cerevisiae* (mit oder ohne Vitamin C) plus HuminFeed<sup>®</sup> besser als derjenigen Versuchstiere in der Kontrolle (ohne HuminFeed<sup>®</sup>) ist.

Hinsichtlich der Reproduktion sind positive signifikante Effekte in den Ansätzen mit HuminFeed<sup>®</sup> erzielt worden (Abbildungen 13 und 17). Huminstoffe könnten als indirekte oder direkte Nahrungs- und Energiequelle dienen (Gellis & Clarke 1935; Baylor & Sutcliffe 1963; Arruda et al. 1983; Salonen & Hammar 1986). Da in den praktischen Versuchen dieser Arbeit HuminFeed<sup>®</sup> Supplementierung mit die Futterqualität Bäckerhefefutters für D. magna verbessert hatte, könnte man davon ausgehen, dass HuminFeed® von D. magna als DOC (gelöster organischer Kohlenstoff) aufgenommen würde. Arruda und seine Kollegen haben 1983 nachgewiesen, dass gelöste organische Substanzen durch den Mechanismus der Adsorption für Daphnienwachstum zur Verfügung gestellt werden können. Ihre Daten deuteten darauf hin, dass der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) als zusätzliches Nahrungsmittel für das im Süßwasser lebende filtrierende Zooplankton. Daher ist es denkbar, dass HuminFeed® als zusätzliche Nahrungsquelle diente.

In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass *D. magna* Dauereier ohne Männchen produzieren kann. Bei **Fütterung mit Bäckerhefe** *S. cerevisiae* (mit oder ohne Vitamin C) traten interessanterweise die **Ephippien ohne Männchen** (in Oktober-Mitte) auf. Die Produktion von Dauereiern stellt eine Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Auftreten von *Daphnia* in räumlich und zeitlich heterogenem Habitat dar und kann daher als eine Überlebensund Verbreitungsstrategie in nicht permanenten Habitaten gelten. Die Dauereier werden vor allem im **Spätherbst** gebildet, weil sich zu diesem Zeitpunkt die Futterbedingungen für die Daphnien deutlich verschlechtern (Alekseev & Lampert 2001). Normaleweise sind Ephippien bzw. Dauereier Stressindikatoren (für Details siehe Einleitung) und nur wenige Arten produzieren Dauereier ohne Männchen (Hebert 1981; Hebert et al. 1989; Spaak 1995). In diesem Fall sind die Ephippien wahrscheinlich **Ieer** (Spaak 1995; Prof. W. Lampert, persönliche Mitteilung per E-Mail).

Der HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz verringerte die Ephippienzahl pro Weibchen und Tag. Jedoch befand sich ein signifikanter Unterschied nur beim Ansatz mit Bäckerhefe und 0.9 mmol/l DOC (\* p<0.05). Da die HuminFeed®-Supplementierung die Ephippien-Produktion verringerte, könnte davon ausgegangen werden, dass die Bäckerhefe durch ihre schlechte Futterqualität zu Ephippien-Produktion führte. Der mechanische Stress beim Umsetzen oder auch Dichtestress scheint nicht der Auslöser für die bei Fütterung Ephippien-Produktion gewesen zu sein, denn Mikrogrünalge P. subcapitata (mit oder ohne HuminFeed®) wurden keine Ephippien entdeckt. Während der Phase der Dauereierproduktion in einer Daphnien-Population produziert nur ein geringer Anteil der Daphnien Dauereier, während die meisten Daphnien Subitaneier produzieren (Spaak, 1995). Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Aussage (Abbildungen 15 und 19).

Bei Fütterung mit Bäckerhefe *S. cerevisiae* (mit oder ohne Vitamin C) konnte in allen Ansätzen, denen HuminFeed<sup>®</sup> zugesetzt wurde, eine deutliche (teilweise signifikante) **Verlängerung** der Lebensspanne im Verhältnis zu den Kontrolltieren festgestellt werden (Abbildungen 12 und 16).

Die Struktur der Huminstoffe enthält verschiedene **Bausteine**. Für den chemischen Stress und auch für die Lebensverlängerung sind im Wesentlichen Polyphenole, Chinone und stabile Radikale verantwortlich, während bioverfügbare Aminosäuren, Aminozucker und Kohlenhydrate keinen oder unter Umständen einen entgegen gesetzten Effekt, nämlich einen lebensverkürzenden Effekt,hervorrufen (Steinberg & Menzel 2009).

Die lebensverlängernde Wirkung von Huminstoffen kann auf deren chemische Struktur (bestimmte funktionelle Gruppen) zurückgeführt werden. Huminstoffe leiten sich u.a. von Polyphenolen wie Ligninen und Tanninen ab (Leenheer & Rostad 2004; Steinberg et al. 2007). Von Polyphenolen ist bekannt, dass sie lebensverlängernde Wirkung besitzen Stressresistenz erhöhen (z. B. Pietsch et al. 2008). 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 (bei Fütterung mit HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz) Bäckerhefe und auf den polyphenolischen Bestandteilen der Huminstoffe beruht. Außerdem scheinen Polyphenole auf Transkriptionsfaktoren zu wirken. In Versuchen mit Quercetin, einem Polyphenol der Untergruppe Flavonoide, wurde u.a. diese Annahme bestätigt (Kampkötter et al. 2008; Saul et al. 2008; Pietsch et al. 2008). Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel **DAF-16** beeinflussen Reproduktionsrate und/oder die Lebensdauer eines Organismus (Gems & McElwee 2003; Yoshinaga et al. 2003, 2005). Bei Aktivierung des Transmembran-Rezeptors IGF-1 (insulin faktor) growth 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). Falls Huminstoffe deaktivierend auf den Rezeptor IGF-1 und aktivierend auf DAF-16 wirkten, könnten sie die

Verlängerung der Lebensdauer hervorrufen (Bouchnak & Steinberg, in prep.).

Die biochemischen Untersuchungen der Diplomarbeit von N. Ouerghemmi 2009 hat festgestellt, dass die zelluläre antioxidative Antwort auf Huminstoffe unterschiedlich mit der Nahrungsqualität war. Entweder induzierten Huminstoffe zusätzlichen Stress (bei Fütterung mit Mikrogrünalge P. subcapitata) oder erhöhten den zellulären antioxidativen Schutz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies ROS, durch die Induktion von L-Prolin und der Ascorbinsäure und einer resultierenden Minderung Wasserstoffperoxydgehaltes (Bei Fütterung mit Bäckerhefe S. cerevisiae). Daher ist anzunehmen, dass die antioxidativen Stressabwehr bei D. magna von Futterqualität und HuminFeed® abhängen. Diese Annahme wird durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützt. Denn Sind positive Effekte der Huminstoffe auf die Lebensparameter von D. magna festgestellt worden.

Die festgestellte Verlängerung der Lebensdauer von *D. magna* durch Zugabe eines Huminstoffes HuminFeed<sup>®</sup> konnte bei Versuchen mit *D. magna*-Männchen und *Moina macrocopa* bestätigt worden (Euent et al. 2008; Rauch 2009).

Die Untersuchungen von Euent et al. haben 2008 gezeigt, dass bei den Weibchen der Art *D. magna* jede Huminstoff-konzentration zu einer Lebensverkürzung und sogar zu verminderter Fruchtbarkeit führte. Für die *D. magna*-Weibchen waren die verwendeten Huminstoffe somit eindeutig toxisch. Für die deutlich kürzer lebenden Männchen dagegen waren diese Stoffe eindeutig lebensverlängernd. 50 % der Männchen lebten bis zu 9 Tagen länger. Dies kann als Beleg sein, dass ein chemischer Stress bei Wirbellosen zu einer geschlechtsspezifischen Lebenszeitmodulation führt.

Im Gegensatz zu den Versuchen von Euent et al. 2008 konnte bei *M. macrocopa* keine Geschlechter-spezifische Veränderung der Lebensdauer durch Huminstoffe beobachtet werden. Sowohl die Weibchen als auch die Männchen zeigten lebensverlängernde Effekte bei Zugabe von Huminstoffen

zum Medium (Rauch 2009). Rauch berichtete 2009, dass Huminstoffe als Stressoren anzusehen sind. In geringen Konzentrationen wirken sie jedoch lebensverlängernd und erhöhen die Reproduktionsrate von *M. macrocopa* (hormetische Effekte). Besonders eindeutige Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Dichtestress erzielt, was ein Hinweis auf eine multiple Stress-Resistenz ist.

Eine **Studie von Hansen et al. 2008** zeigte, dass elementar mangelhafte Futterqualität die Toxizität von Fluoxetine auf *D. magna* reduziert. Hansen und seine Kollegen 2008 fanden eine starke Interaktion zwischen Fluoxetine und dem C:P-Verhältnis des Algenfutters aufs Überleben von *D. magna* während des 2-wochigen Experimentes. In Abwesenheit von Fluoxetine reduzierte der geringe P-Gehalt des Algenfutters die Überlebensrate der Versuchstiere, während steigende Konzentrationen von Fluoxetinen zu einer Senkung der Überlebensrate der Versuchstiere führten, die mit ausreichend Phosphor im Algenfutter gefüttert wurden. **Interaktive Effekte** zwischen der elementaren Futterqualität und Fluoxetinen wurde ebenfalls in Bezug auf Wachstum und Reproduktion von *D. magna* beobachtet. Da Bäckerhefe *S. cerevisiae* ein schlechtes Futter für Zooplankton ist und die Huminstoffe eine toxische Wirkung haben (Cazenave et al. (2006), könnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Aussage der oben genannten Hansen-Studie akzeptieren und/oder unterstützen.

Zwischen den mit Bäckerhefe *S. cerevisiae* gefütterten Versuchstieren und denjenigen, die mit Bäckerhefe plus Vitamin C (Ascorbinsäure) gefüttert wurden, gab es **kaum Unterschiede** (sowohl im Überlebenstest als auch im Reproduktionstest). Vermutet wird, dass entweder HuminFeed<sup>®</sup> photolytisch abgebaut wird und dadurch ROS (reactive oxygen species) gebildet werden (siehe Steinberg & Paul 2008). Dann hätte Vitamin C (bei Fütterung mit Bäckerhefe plus Vitamin C) als Radikalfänger die im Medium gebildeten ROS statt die unter HuminFeed<sup>®</sup>-Stress im Körper der Versuchstiere gebildeten ROS gefangen.

Bäckerhefe *S. cerevisiae* enthält Ascorbinsäure oder ähnliche spontane Anitoxidanzien wie zum Beispiel Erythroascorbinsäure (Huh et al. 1998; Amako et al. 2006). Daher wäre anzunehmen, dass die in Bäckerhefe Ascorbinsäure bzw. Erythroascorbinsäure die kaum unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dem Futter (Bäckerhefe plus Vitamin C) und dem Futter (Bäckerhefe ohne Vitamin C) erklären könnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Laborexperimente die Eingangs gestellte Hypothese der Beeinflussung der Lebensparameter von *D. magna* durch die Nahrungsbedingungen bzw. durch HuminFeed<sup>®</sup> teilweise signifikant bestätigt werden konnte. Verschiedene Lebensparameter, wie die Gelegegröße bzw. die Nachkommenrate und das Überleben der Versuchstiere, zeigten sich von der Futterqualität und der HuminFeed<sup>®</sup>-Konzentration beeinflusst. Andere Lebensparameter, wie die Dauer der Entwicklung bis zur Reife, waren von den Nahrungsbedingungen offenbar nicht beeinflusst.

## 5 Schlussfolgerung

Die am Anfang dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass Daphnien, die mit der Mikrogrünalge *Pseudokirchneriella subcapitata* gefüttert wurden, bessere Reproduktion und Überlebenschance aufweisen würden als Daphnien, die mit Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder Bäckerhefe plus Vitamin C gefüttert wurden, kann mit den gewonnenen Resultaten nur bezüglich des Reproduktionstests bestätigt werden (Tabelle 10).

Versuchstiere, die mit Bäckerhefe gefüttert wurden, haben tendenziell länger überlebt als die Versuchstiere, die mit der Mikrogrünalge *P. subcapitata* gefüttert wurden.

Überdies wurde erwartet, dass die Lebensparameter der Versuchstiere in Anwesenheit von HuminFeed<sup>®</sup> schlechter wäre im Vergleich zu den Lebensparametern der Versuchstiere, die ohne HuminFeed<sup>®</sup> eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese Hypothese nur im Reproduktionsversuch auf Mikrogrünalge *P. subcapitata* (Abbildungen 10 und 11) unterstützen. Unter den Bedienungen dieser Arbeit (z. B. Dichte der Versuchstiere: 5 Versuchstiere pro 100 ml Kolben) hat HuminFeed<sup>®</sup> keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensdauer der Versuchstiere, wenn die Versuchstiere mit *P. subcapitata* gefüttert wurden (Abbildung 9).

Bei Versuchstieren, die mit Bäckerhefe *S. cerevisiae* oder Bäckerhefe plus Vitamin C gefüttert wurden, spielte HuminFeed<sup>®</sup> eine positive Rolle, denn sowohl die Reproduktionsrate als auch die Überlebensrate waren deutlich (teilweise signifikant) bei den Versuchstiere mit HuminFeed<sup>®</sup>-Zusatz erhöht. Die Ergebnisse dieser und bereits publizierter Arbeiten (siehe Diskussion) lassen den Schluss zu, dass HuminFeed<sup>®</sup> eine Verlängerung des Lebens von den Organismen im Süßwasser bewirken kann. Da Nicht alle Huminstoffqualitäten gleich wirken, sind noch die Einflüsse der

verschiedenen Huminstoffpräparate auf die Lebensparameter von *D. magna* als Modellorganismus zu testen.

Um eine bessere Aussage und genauere Ergebnisse zu erfassen, wird empfohlen, nur ein Versuchstier in 100 ml Gläschen zu halten, um Fehler zum Beispiel bei der Ermittelung der Nachkommenzahl pro Weibchen zu vermeiden, da die Nachkommen nicht bei allen Versuchstieren, trotz ihres gleichen Alters, gleichzeitig schlüpfen. Auch 5 Versuchstiere pro 100 ml Gläschen führen zu Dichtestress, was sich zum Beispiel auf die Überlebenschance auswirkt und zur Ephippien-Produktion führen könnte.

#### 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

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.

Alekseev, V.R.; Lajus, D.L. (2009): Maternal and direct effects of natural-like changes of photoperiod and food condition manipulation on life history parameters in *Daphnia*. Aquat. Ecol. DOI 10.1007/s10452-008-9168-9.

Alekseev, V.; Lampert, W. (2001): Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. Nature, Vol. (414): 899-901.

Amako, K.; Fujita, K.; Shimohata, T.; Hasegawa, E.; Kishimoto, R.; Goda, K.; (2006): NAD+-specific D-arabinose dehydrogenase and its contribution to erythroascorbic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters (580): 6428–6434.

Apel, K.; Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. (55): 373–399.

Arruda, J. A.; Marzolf, G. R.; Faulk, R. T. (1983): The role of suspended sediments in the nutrition of zooplankton in turbid reservoirs. Ecology (64): 1225-1235.

Baylor, E.R.; Sutcliffe, W.H., Jr. (1963): Dissolved organic matter in seawaer as a source of particulate food. Limnol. Oceanogr. (8): 369–371.

Berberovic, R.; Bikar, K.; Geller, W. (1990): Seasonal variability of the embryonic development time of three planktonic crustaceans: dependence on temperature, adult size, and egg weight. Hydrobiologia (203): 127–136.

Boersma, M.; Vijverberg, J. (1994): Possible toxic effect on *Daphnia* resulting from the green alga *Scenedesmus obliquus*. Hydrobiologia (294): 99-103.

Bouchnak, R.; Steinberg, C.E.W. (in prep.): *Daphnia magna* Straus: multiple stress and longevity. Limnologica.

Cazenave, J.; de los Ángeles Bistoni, M.; Zwirnmann, E.; Wunderlin, D. A.; Wiegand, C. (2006): Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos—benefits and costs of microcystin detoxication. Environ. Toxicol. (21): 22–32.

Claußen, F. (2008): Einfluss von gelösten Huminstoffen auf Wachstum, Flureszenzcharakteristika und biochemische Stressindikatoren der coccalen Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata*. Diplomarbeit an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg. Institut für Chemie und Biologie des Meeres.

Coors, A.; Hammers-Wirtz, M.; Ratte, H.T. (2004): Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. Chemosphere (56): 395-404.

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 phosphorus-deficient diets on the carbon and phosphorus balance of *Daphnia magna*. Limnol. Oceanogr. (43): 1147–1161.

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.

Flaherty, C.M.; Dodson, S.I. (2005): Effects of pharmaceuticals on Daphnia survival, growth and reproduction. Chemosphere (61): 200-207.

Fryer, G. (1991): Functional morphology and the adaptive radiation of Daphniidae (Branchiopoda: Anomopoda). Phil. Trans. r. Soc., Lond., B 331 (1259): 1-99.

Geller, W. (1975): Die Nahrungsaufnahme von *Daphnia pulex* in Abhängigkeit von der Futterkonzentration, der Temperatur, der Körpergröße und dem Hungerzustand der Tiere. Arch. Hydrobiol. Suppl. (48): 47–107.

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

Gellis, S.S.; Clarke, G.L. (1935): Organic matter in dissolved and colloidal form as food for *Daphnia magna*. Physiol. Zool. (8): 127–137.

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.

Gliwicz, Z.; Lampert, W. (1994): Clutch-size variability in *Daphnia*: Body-size related effects of egg predation by cyclopoid copepods.- Limnol. Oceanogr. (39): 479-485.

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.

Hansen, L.K.; Frost, P.C.; Larson, J.H.; Metcalfe, C.D. (2008): Poor elemental food quality reduces the toxicity of fluoxetine on an aquatic invertebrate. Aquat. Toxicol. (86): 99-103.

He, X.; Wang, W. X. (2008): Stoichiometric regulation of carbon and phosphorus in P-deficient *Daphnia magna*. Limnol. Oceanogr. 53(1): 244–254.

Hebert, P.D.N. (1978): The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). Biol. Rev. (53): 387-426.

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.

Heckmann, L.H.; Callaghan, A.; Hooper, H.L.; Connon, R.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Sibly, R.M. (2007): Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics. Toxicol. Lett. (172): 137-145.

Heckmann, L.H.; Sibly, R.M.; Connon, R.; Hooper, H.L.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Hill, C.J.; Bouetard, A.; Callaghan, A. (2008): Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. Genome Biology 2008, 9:R40 (1-14).

Hessen, D. O. (1990): Carbon, nitrogen and phosphorus status in *Daphnia* at varying food conditions. J. Plankton Res. (12): 1239-1249.

Hessen, D.O.; N.E. W. Alstad; L. Skardal (2000): Calcium limitation in *Daphnia magna.*- J. Plankton Res. (22): 553-568.

Hobæk, A.; Larsson, P. (1990): Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology (71): 2255–2268.

Huh, W.-K.; Lee, B.-H.; Kim, S.-T.; Kim, Y.-R.; Rhie, G.-E.; Baek, Y.-W.; Hwang, C.-S.; Lee, J.-S. Kang; S.-O. (1998): D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol. (30): 895–903.

Hülsmann, S. (2001): Reproductive potential of *Daphnia galeata* in relation to food conditions: implications of a changing size-structure of the population.-Hydrobiologia (442): 241-252.

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.

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.

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.

Krause-Dellin, D.; Steinberg, C. (1986): Cladoceran remains as indicators of lake acidification. Hydrobiologia (143): 129–134.

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.; Rothhaupt, K.O. (1991): Alternating dynamics of rotifers and *Daphnia magna* in a shallow lake. Arch. Hydrobiol. (120): 447-456.

Lampert, W.; Sommer, U. (1993): Limnoökologie. Thieme, Stuttgart.

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

Limburg, P. (2000): Molekularbiologische Untersuchungen einer *Daphnia*-Population im Belauer See: Entstehung, Einfluss und Entwicklung der Dauereibank. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Max- Planck-Institut für Limnologie, Plön.

Martins, J.; Soares, M.L.; Saker, M.L.; OlivaTeles L.; Vasconcelos V.M. (2007): Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. (67): 417–422.

McMaster, D.; Bond, N. (2008): A field and experimental study on the tolerance of fish to *Eucalyptus camaldulensis* leachate and low dissolved oxygen concentration. Mar. Freshwat. Res. (59): 177–185.

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. Aguat. Toxicol. (83): 93–103.

Meinelt, T.; Schreckenbach, K.; Pietrock, M.; Heidrich, S.; Steinberg, C.E.W. (2008): Humic substances (review series). Part 1. Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. Environ. Sci. Poll. Res. (15): 17–22.

Michels, E.; De Meester, L. (1998): The influence of food quality on the phototactic behaviour Daphnia magna Straus. Hydrobiologia (379): 199–206.

Muñoz-Mejía, G.; Martínez-Jerónimo, F. (2007): Impact of algae and their concentrations on the reproduction and longevity of cladocerans. Ann. Limnol. (43): 167–177.

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

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.

Olmstead, A.W.; LeBlanc, G.A. (2007): The Environmental-Endocrine Basis of Gynandromorphism (Intersex) in a Crustacean. Int. J. Biol. Sci (3): 77 – 84.

Ouerghemmi, N. (2009): Konditionierung der antioxidativen Stressabwehr bei *Daphnia magna*: biochemische Analyse. Diplomarbeit an der Potsdam Universität. Institut für Biochemie und Biologie, Professur für Ökologie und Ökosystemmodellierung.

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 (2007) 15:1–9. DOI 10.1007/s10499-006-9060-3

Peña-Aguado, F.; Nandini, S.; Sarma S.S.S. (2005): Differences in population growth of rotifers and cladocerans raised on algal diets supplemented with yeast. Limnologica (35): 298–303.

Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R., Steinberg, C.E.W. (2008): Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age-1*, *daf-2*, *sek-1* and *unc-43*. Biogerontology, DOI 10.1007/s10522-008-9199-6.

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.

Prokhotskaya V.Y.; Steinberg C.E.W. (2007): Differential Sensitivity of a coccal green algal and a cyanobacterial species to dissolved organic matter (NOM). Environ. Science and Pollution Research (14): 11 - 18.

Rauch, R. (2009): Das Huminstoffpräparat HuminFeed moduliert Lebensdauer und Fruchtbarkeit von *Moina macrocopa* Straus. Bachelorarbeit an der Humboldt Universität zu Berlin. Institut für Biologie, Arbeitsgruppe Gewässer- und Stressökologie.

Ren, Z.; Li, Z.; Ma, M.; Wang, Z.; Fu, R. (2009): Behavioral responses of Daphnia magna to stresses of chemicals with different toxic characteristics. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 82 (3): 310-316.

Rohrlack, T.; Dittmann, E.; Henning, M.; Börner, T.; Kohl, J. G. (1999): Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. (65): 737–739.

Salonen, K.; Hammar, T. (1986): On the importance of dissolved organic matter in the nutrition of zooplankton in some lake waters. Oecologia (8): 246–253.

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

Schmidt, K.; Steinberg, C.E.W.; Staaks, G.B.O.; Pflugmacher, S. (2005): Influence of a Xenobiotic Mixture (PCB and TBT) Compared to Single Substances on Swimming Behavior or Reproduction of *Daphnia magn.* Acta hydrochim. hydrobiol. 33 (2005) 4, 287–300..

Schmidt, K.; Staaks, G.B.O.; Pflugmacher, S.; Steinberg, C.E.W. (2006): The influence of Tributyltin Chloride and Polychlorinated Biphenyls on Swimming Behavior, Body Growth, Reproduction and Biotransinformation Enzymes in *Daphnia magna*. J. Freshwat. Ecol., Vol. 21, No.1: 109-120.

Schwartz, S.S.; Hebert, P.D.N. (1987): Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. Freshw. Biol. (17): 373-380.

Shurin, J. B.; Dodson, S.I. (1997): Sublethal Toxic Effects of Cyanobacteria and Nonylphenol on Environmental sex Determination and Development in *Daphnia*. Environmen. Toxicol. Chem., Vol. 16, No. 6: 1269-1276.

Ślusarczyk, M. (1995): Predator-induced diapause in *Daphnia*. Ecology (76): 1008- 1013.

Ślusarczyk, M.; Dawidowicz, P.; Rygielska, E. (2005): Hide, rest or die: a light-mediated diapause response in *Daphnia magna* to the threat of fish predation. Freshwat. Biol. (50): 141–146.

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., 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.; Paul, A. (2008): Ecological Processes: Photolysis. Encyclopedia of Ecology, 2724-2732.

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.

Sterner, R.W. (1990): The ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by herbivores: zooplankton and the algal competitive arena. American Naturalist (136): 209-229.

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.

Straile, D.; Geller, W. (1998): The response of *Daphnia* to changes in trophic status and weather patterns: A case study from Lake Constance. ICES J. Mar. Sci. (55) 775–782.

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.

Timofeyev, M.A., Shatilina, Z.M., Kolesnichenko, A.V., Kolesnichenko, V.V., Steinberg, C.E.W. (2006b): Specific antioxidant reactions to oxidative stress promoted by natural organic matter (NOM) in two amphipod species from Lake Baikal. Environ. Toxicol. 21, 104–110.

Timofeyev, M.A.; Shatilina, Z.M.; Bedulina, D.S.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.W. (2007): Natural Organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochem. Molecul. Biol. (146): 496 – 503.

Timofeyev, M.A.; Protopopova, M.; Pavlichenko, V.; Steinberg, C.E.W. (2009): Can acclimation of amphipods change their antioxidative response? Aguat. Ecol. DOI 10.1007/s10452-008-9217-4.

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

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

Veen, M.; Lang, C. (2004): Production of lipid compounds in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol. (63): 635–646.

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

Wachtler, V.; Balasubramanian, M.K. (2006): Yeast lipid rafts? – An emerging view. Trend in Cell Biology Vol.16, No. 1, 1-4.

Wacker, A.; Martin-Creuzburg, D. (2007): Allocation of essential lipids in *Daphnia magna* during exposure to poor food quality. Function. Ecol. (21): 738–747.

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

Winner; R. W. (1984): Selenium effects on antennal integrity and chronic copper toxicity in *Daphnia pulex*.- Bull. Environ. Contam. Toxicol. (33): 605-611.

Yoshinaga, T.; Kaneko, G.; Kinoshita, S.; Tsukamoto, K.; Watabe, S. (2003): The molecular mechanisms of life history alterations in a rotifer: A novel approach in population dynamics. Comp. Biochem. Physiol. B (136): 715–722.

Yoshinaga, T.; Kaneko, G.; Kinoshita, S.; Furukawa, S.; Tsukamoto, K.; Watabe, S. (2005): Insulin-like growth factor signaling pathway involved in regulating longevity of rotifers. Hydrobiologia (546): 347–352.

Zaffagnini, F. (1987): Reproduction in *Daphnia*.- Mem. Ist. Ital. Idrobiol. (45): 245 284.

Zarattini, P.; Mura, G. (2004): The effects of food type on length-weight growth, sexual differentiation, and survival in *Chirocephalus ruffoi* (Anostraca) cultured under standard conditions. J. Crusta cean Biol. (24): 225–231.

#### E-Mails

Winfried Lampert: Prof in Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie in Plön, Deutschland, am 09.09.08 und 10.09.08.

#### Internetseite

http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=33105 stand am 02.12.08.

http://de.wikipedia.org/wiki/Daphnien stand am 08.04.09.

http://www.cladocera.de/cladocera/cladocera.html stand am 08.04.09.

http://www.humintech.com/001/animalfeeds/products/huminfeed.html stand am 18.04.09.

http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=559931&tree=0.1 stand am 01.02.09.

http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetail.jsp stand am 01.02.09.

http://de.wikipedia.org/wiki/Backhefe stand am 07.04.09.

http://www.mskreport.com/articles.cfm?articleID=2911 stand am 08.04.09.

http://www.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=2625&tree=0.1 stand am 01.02.09.

http://de.wikipedia.org/wiki/Ascorbins%C3%A4ure stand am 09.04.09

## **Anhang**

## Einige Schritte der Versuchdurchführung auf Mikrogrünalge Pseudokirchneriella subcapitata

#### **Algenmedium**

Als Nährmedium zur Algenkultivierung wurde das Frischwasser Medium FW04-Medium (Nicklisch et al. 2008) verwendet (Tabelle 6). Zur Herstellung von 5 Liter des Nährmediums wurde in 1 Liter Reinstwasser (Reinstwasseranlage PRO 90 CN, Seralpur, Burladingen) Calciumcarbonat (CaCO<sub>3</sub>) unter CO<sub>2</sub>-Zusatz und Rühren gelöst. Mit weiteren 3.5 I destilliertes Wasser wurden die anderen Makroelementen zugegeben. 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<sub>2</sub> (in Konzentration von 0.007 g/100ml) zugefügt, dann mit destilliertem Wasser auf 5 I aufgefüllt und sterilfiltriert (Glassfibre Prefilter; Cellulose-Acetat-Filter 0.2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen). Die Aufsätze mit dem Filter und die Mediumvorratsflaschen wurden vor der Filtration schon autoklaviert (Sysrec 5050ELV, Tuttnauer, Wettenberg). Die Sterilfiltration des Nährmediums wurde unter der Laminarbox durchgeführt. Im Kühlschrank (dunkel, 6 °C) wurde das Nährmedium bis zur weiteren Verwendung gelagert. Im Gleichgewicht mit der Luft bei 20 °C sollte pH-Wert von ca. 8.3 betragen.

#### Algenkultivierung

Die Algen wurden in einer *batch*-Kultur (diskontinuierliche Kultur) kultiviert (Kohl und Nicklisch 1988). Um die Algen unter weitgehend sterilen Bedingungen zu kultivieren und Kontaminationen zu vermeiden, wurden die

hier verwendeten Gefäße autoklaviert. Autoklavierte Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 500 ml wurden jeweils unter der Laminarbox mit Algenmedium befüllt, mit einer kleinen Menge (ca. 30 ml) der Stammkultur der Mikrogrünalge *P. subcapitata* angeimpft und dann mit einem Silikonstopfen verschlossen (Abbildung 6). 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. Unter Standardlaborbedingungen bei einer Temperatur von 21±1 °C und 24 h Dauerlicht wurden die Algen im Daphnienzuchtraum kultiviert. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren (cool white und warm white, L36 W/20 von Osram, München oder von Lampi).

#### Algenbiovolumenbestimmung

Für die Bestimmung des Biovolumens (mm³/l) der Mikrogrünalge P. subcapitata stand ein Zellanalysesystem (CASY1, Schärfe, Reutlingen, Deutschland) zur Verfügung. Dieses ist in der Lage, Anzahl und mittleres Volumen der einzelnen Zellen der Alge zu bestimmen und daraus das Biovolumen abzuleiten. Die weitere Bestimmung des Biovolumens erfolgte Photometer (Eppendorf Gerätebau GmbH, iedoch am Hamburg, Deutschland). Die Extinktion wurde bei 546 nm gemessen. Der Nullabgleich wurde mit destilliertem Wasser durchgeführt. Die Messungen am CASY1 dienten der Erstellung einer Eichkurve zur photometrischen Messung. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 7 verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Die mit dem Photometer ermittelte Extinktion und das zellanalytisch bestimmte Biovolumen wurden so zueinander in Beziehung gesetzt, dass eine Eichkurve ermittelt werden konnte (Abbildung A). Deshalb war in allen weiteren Biovolumenbestimmungen nur die photometrische Messung erforderlich. Anhand der Eichkurve war es möglich eine konstante Dosierung der Futteralge während der Versuchsdauer beizubehalten.

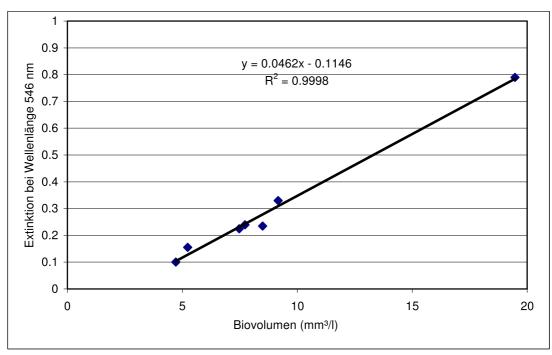


Abbildung A: Korrelation zwischen Biovolumen und Extinktion von P. subcapitata

In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, wie sich unterschiedliche Futterqualitäten plus chemischer Stress durch HuminFeed® auf die Langlebigkeit und Fruchtbarkeit von *D. magna* auswirken. Deshalb wurde darauf geachtet, dass die Konzentration der Futteralge während des gesamten Zeitraumes dieser Arbeit möglichst identisch blieb (ca. 8 mm³/l Biovolumen; entspricht ca. 8 mg/l Biomasse). Die Algenfutterkonzentration wurde durch Verdünnen einer entsprechenden Menge Algensuspension mit dem Daphnienmedium erzeugt. Sowohl über die Biovolumenbestimmung als auch über die Farbe der Algensuspension während der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Futterkonzentration in den Versuchen ermittelt. 6 bis 7 Tage nach dem Ansetzen der Algenkulltur wurden ca.100 bis 150 ml Algensuspension einem 1 Liter Daphnienmedium zugesetzt.

## Selbständigkeitserklärung

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

Cottbus, den 30.04.09

Rihab Bouchnak